Aus der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. H. Dettmar

Steroidhormon-Rezeptoranalysen im Nierenkarzinom des Menschen - ein molekularbiologischer Beitrag zur Hormontherapie des hypernephroiden Nierenkarzinoms

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
als Habilitationsschrift für das Fach Urologie vorgelegt

von

Klaus Maar

Düsseldorf, im Februar 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0006

Aus der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. H. Dettmar

Steroidhormon-Rezeptoranalysen im Nierenkarzinom des Menschen - ein molekularbiologischer Beitrag zur Hormontherapie des hypernephroiden Nierenkarzinoms

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf als Habilitationsschrift für das Fach Urologie vorgelegt

von

Klaus Maar

Düsseldorf, im Februar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Vorwort	1 - 2
II	Einleitung	3
1.	Therapiemöglichkeiten des metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinoms	3
1.1.	Nicht hormonelle Therapieformen	3 - 9
1.2.	Hormontherapie	9 - 14
2.	Molekularbiologische Wirkung der Steroidhormone	14 - 17
3.	Nachweismöglichkeiten des Hormonrezeptors	17 - 21
4.	Experimentelle Grundlagen der Hormontherapie	
4.1.	Tierexperimentelle Erzeugung von Nierentumoren	21 - 23
4.2.	Östrogen rezeptoren in der Niere verschiedener Tierspezies	24 - 25
4.3.	Östrogenrezeptoren in der menschlichen Niere und im menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom	25 - 26
III	Ziele der Arbeit	27 - 31
IV	Gestagen-, Glucocorticoid- und Androgen-Rezeptoranalysen im hypernephroiden Nierenkarzinom des Menschen	32

Seite

IV. 1. Material und Methoden 32

1a. Material 32

1a.1. Chemikalien 32

1a.1.1. Radioaktiv markierte Verbindungen 32 - 33

1a.1.2. Chemikalien mit hormoneller Wirkung 33

1a.1.3. Spezielle Chemikalien 33 - 34

1a.1.4. Weitere Chemikalien 34

1a.2. Organe 34

1a.2.1. Hypernephroide Nieren-karzinome 34 - 35

1a.2.2. Uteri 35 - 36

IV. 1b. Methoden 36

1b.1. Rezeptoranalysen im Tumorcytosol 36

1b.1.1. Cytosolpräparation 36 - 37

1b.1.2. Gestagen-Rezeptoranalysen in Tumor-cytosolpräparationen nicht Östrogen-vorbehandelter Patienten 37

1b.1.2a. Bindungsaffinität und -kapazität 37 - 39

1b.1.2b. Hormonspezifität der Bindung 39 - 40

1b.1.2c. Dichtegradientenzentrifugation 40 - 41

1b.1.3. Gestagen-Rezeptoranalysen in Tumor-cytosolpräparationen Östrogen-vorbehandelter Patienten 41 - 42

1b.1.4	Inhibitoren der Gestagenbindung	42
1b.1.4a.	Uteruscytosolherstellung	42 - 43
1b.1.4b.	Inhibitoranalysen	43 - 44
1b.1.5	Glucocorticoid-Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen	44
1b.1.5a.	Bindungsaffinität und -kapazität	44
1b.1.5b.	Hormonspezifität der Bindung	44
1b.1.6	Androgen-Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen	45
1b.1.6a.	Bindungsaffinität und -kapazität	45
1b.1.6b.	Hormonspezifität der Bindung	45 - 46
1b.2	Enzymatische Isolierung vitaler Tumorzellen	46 - 48
1b. 3	Bestimmung der Viabilität enzymatisch isolierter Tumorzellen	48
1b.4	Vorbereitung der Tumorzellen zur Licht- und Elektronenmikroskopie	48 - 49
1b.5	Rezeptoranalysen und Hormonwirkungsstudien an vitalen enzymatisch isolierten Tumorzellen	49
1b.5.1.	Bestimmung der Affinität und -kapazität der Gestagenbindung	49

Seite

1b.5.2. Bestimmung der Affinität und Kapazität der Glucocorticoidbindung 50

1b.5.3. Proteinsyntheseraten unter dem Einfluß von Steroidhormonen 50.- 53

1b.6. Proteinbestimmung von Cytosolen 53

1b.7. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen 54

V. Ergebnisse 55

1. Steroidhormon-Rezeptoranalysen im Tumorcytosol 55

1a. Bindungsstudien mit dem synthetischen Gestagen R 5020 bei Östrogen-unvorbehandelten Patienten 55 - 62

1b. Bindungsstudien mit dem synthetischen Gestagen R 5020 bei Östrogen-vorbehandelten Patienten 62 - 66

1c. Nachweis cytosolischer Inhibitoren der R 5020-Bindung 66 - 68

1d. Glucocorticoid-Rezeptorstudien 69 - 74

1e. Androgen-Rezeptorstudien 74 - 79

2. Untersuchungen an enzymatisch isolierten Tumorzellen 80

2a. Zellmorphologie 80 - 89

2b. Hormonrezeptoranalysen 90

			Seite
	2b.1.	R 5020-Bindungsstudien	90 - 92
	2b.2.	Glucocorticoid-Bindungsstudien	93 - 94
	2b.3.	Proteinsyntheseraten enzymatisch isolierter vitaler Nierenkarzinomzellen unter dem Einfluß von Steroidhormonen	95 - 97
VI.		Diskussion	98 - 99
	1.	Rezeptoranalysen im Tumorcytosol	
	1a.	Gestagen-Rezeptoranalysen bei Östrogen-unvorbehandelten und -behandelten Patienten	99 - 104
	1b.	Inhibitoren der Gestagenbindung	105 - 107
	1c.	Glucocorticoid - Rezeptoranalysen	107 - 110
	1d.	Androgen - Rezeptoranalysen	110 - 115
	2.	Rezeptoranalysen und Hormonwirkungsstudien an vitalen enzymatisch isolierten Tumorzellen	115
	2a.	Zellisolierungsverfahren und Zellmorphologie	115 - 118
	2b.	Untersuchung der Gestagenbindung	118 - 119
	2c.	Analyse der Glucocorticoidbindung	119
	2d.	Einfluß von Steroidhormonen auf die Proteinsyntheseraten der Tumorzellen	119 - 121
VII		Schlußfolgerungen	121 - 123
VIII		Ausblick	123 - 124
IX		Literaturverzeichnis	125 - 147

I Vorwort

Neben der Urologischen Universitätsklinik Düsseldorf (Prof. Dr. H. Dettmar) stellten die folgenden Kliniken Organmaterial für die vorliegende Arbeit zur Verfügung:

1) Klinikum Wuppertal-Barmen
(Prof. Dr. med. K.F. Albrecht)

2) Städt. Krankenanstalten Krefeld
(Prof. Dr. med. F. Baumbusch)

3) Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf
(Prof. Dr. L. Beck)

4) Urologische Universitätsklinik Bonn
(Prof. Dr. med. W. Vahlensieck)

5) Marien-Hospital Düsseldorf
(Dr. med. F. Brunzema)

6) Urologische Universitätsklinik Köln
(Prof. Dr. med. R. Engelking)

7) Städt. Krankenanstalten Leverkusen
(Prof. Dr. med. G. Kierfeld)

8) Krankenhaus Köln-Holweide
(Dr. med. H.D. Lehmann)

9. Urologische Abteilung der II. Chirurgischen Universitätsklinik Köln-Merheim
(Dr. med. V. Lent)

10. Urologische Universitätsklinik Essen
(Prof. Dr. med. P. Mellin)

11. Prosper-Klinik Recklinghausen
(Prof. Dr. med. R. Meridies)

12. Marien-Hospital Duisburg
(Dr. med. H. Stürenberg)

13. St. Vinzenz-Hospital Duisburg
(Dr. med. E. Wölk)

14. Urologische Klinik Golzheim, Düsseldorf
(Dr. med. D. Zoedler).

II. Einleitung

II. 1. Therapiemöglichkeiten des metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinoms

Das hypernephroide Nierenkarzinom liegt in 75 - 80 % aller Nierenmalignome vor (167, 182) und weist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in 25 - 79 % Metastasen auf (139, 178, 206). Die Prognose dieser Erkrankung ist deshalb ungünstig und wird u.a. von der Art der Therapie mitbestimmt. Bezogen auf die Thematik dieser Arbeit lassen sich die Therapiemöglichkeiten in nicht hormonelle Therapieformen und die Hormontherapie einteilen.

II.1.1. Nicht hormonelle Therapieformen

Neben der Tumornephrektomie und der Bestrahlung (Hochvolttherapie) müssen außer der zytostatischen Chemotherapie noch verschiedene Formen einer Kombinationstherapie sowie die Immuntherapie erwähnt werden.

Die chirurgische Intervention in Form der Tumornephrektomie steht bei nicht metastasierendem Nierenkarzinom therapeutisch an erster Stelle. Die Notwendigkeit der Tumornephrektomie liegt in der Beseitigung der Schmerz- und Blutungsquelle, der Tumor-Massen-Reduktion und der statistisch gesicherten

prognostisch günstigen Aussichten nach dieser Operation. In ganz vereinzelten Fällen kann es zudem postoperativ zu Spontanregressionen von Metastasen kommen (24, 62, 65, 85, 185). Liegen Solitärmetastasen vor, nimmt man im allgemeinen dennoch die Tumornephrektomie vor, während bei diffuser Filialisierung teilweise die Indikation zur Operation sehr kritisch gestellt wird (5, 33, 64, 139, 145). Die Prognose nach einer Tumornephrektomie wird verbessert: ARNER (2) sah bei nicht nephrektomierten Patienten eine 5- und 10-Jahres-Überlebenschance von 38 und 30 % gegenüber 48 und 39 % bei Patienten, die Tumor-nephrektomiert wurden. WAGLE (205) und TSUCHIDA (201) berichten bei operierten Patienten über eine 5-Jahresheilung von 41 bzw. 39 %. In allen Fällen lagen allerdings klinisch keine nachweisbaren Metastasen vor.

Trotz Prognoseverbesserung durch urologisch-chirurgische Intervention sind zusätzlich therapeutische Maßnahmen erforderlich, wie sie sich in der Strahlentherapie anbieten.

Die Strahlentherapie (Hochvolttherapie) läßt sich in drei Bestrahlungsmodi einteilen:

1) präoperative Bestrahlung

2) postoperative Bestrahlung

3) präoperative Kurzzeitvorbestrahlung kombiniert mit postoperativer Nachbestrahlung.

Der Wert der Strahlentherapie nach erfolgter Tumornephrektomie wird heute im allgemeinen anerkannt.

Vergleicht man die Ergebnisse der alleinigen Nephrektomie mit der Kombination aus operativer Intervention und Nachbestrahlung bezüglich der 5-Jahresüberlebenszeit, so führt die zusätzliche postoperative Bestrahlung zu einer deutlichen Prognoseverbesserung (34, 60, 72, 80, 89, 115, 120, 148, 153, 160, 173, 202).

Wert und Indikation der präoperativen Bestrahlung werden dagegen unterschiedlich beurteilt.

Schon 1934 führen WATERS (208) und WHARTON (211) eine präoperative Radiatio durch. Neben RICHES (165 - 170) empfehlen neuerdings auch WELLS (210), FLOCKS (64), REBOUL (163) und ROST (1974) die Vorbestrahlung.

Wägt man Vor- und Nachteile einer alleinigen präoperativen Bestrahlung gegeneinander ab, muß festgehalten werden, daß z.Z. der Wert dieser therapeutischen Maßnahme für die Klinik noch nicht einheitlich beurteilbar ist (9, 49, 64, 147, 163, 165 - 170, 173).

Eine weitere strahlentherapeutische Alternative ist in der präoperativen Kurzzeitbestrahlung in Kombination mit einer postoperativen Nachbestrahlung gegeben. Auf dem deutschen Röntgenkongreß 1970 wurde ein "Kurzzeitbestrahlungsschema" erarbeitet (117, 214), das die Vorteile

der Vorbestrahlung ("Devitalisierung" der Tumorzellen) mit geringer präoperativer Wartezeit verbindet.

Ergebnisse der Kombinationsbehandlung liegen heute noch nicht vor; die Argumentation für diese Methode erscheint so stichhaltig, daß mehrere Kliniken in der Bundesrepublik Deutschland sie praktizieren (63, 68, 69, 119, 183, 202).

Die Strahlentherapie hat bei der Bekämpfung des Nierenkrebses eine Verbesserung der Prognose erbracht und muß klinisch noch mehr erprobt werden.

Die günstigen Erfahrungen, die man mit Zytostatika bei der Therapie der akuten Leukämie gemacht hat, versuchte man auch beim metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinom anzuwenden. Zellkinetisch gesehen sind beide Neoplasmen verwandt, da sie langsam proliferieren. Im Vergleich zu Normalzellen haben sie eine verlängerte zelluläre Überlebenszeit bei gleichzeitig verlängerter Generationszeit (62). Der klinische Einsatz dieser zytostatischen Substanzen hat jedoch gezeigt, daß diese bei der Therapie des metastasierenden Nierenkarzinoms fast bedeutungslos sind.

WOODRUFF (1967, 213) betont die relative Unwirksamkeit von über 35 verschiedenen zytostatischen Substanzen, die bei 270 Patienten zu nur kurzfristigen objektiven Rückbildungen führten. Ähnlich wirkungslos sind Endoxan (9,

36, 52, 204), Ifosfamid (37), Thio-TEPA und Bleomycin (25, 44, 86, 99, 136, 194).

Neuere Zytostatika (CAVALLI, 1978, 45) sind beim Nierenkarzinom nicht von therapeutischem Nutzen bzw. sind noch nicht erprobt worden.

Insgesamt zeigt sich, daß Zytostatika von sehr geringem therapeutischen Wert in Form der Monotherapie sind. Lediglich Vinblastin (Velbe^{R}) und die Susbstanz CCNU scheinen einen gewissen inhibitorischen Effekt auf den Tumor bzw. die Metastasen auszuüben (77, 94, 133, 141, 145, 194).

Klinische Berichte über verschiedene Formen einer Kombinationstherapie bei diesem Malignom, insbesondere mit der Mehrfachzytostatika-Therapie, zeichnen ebenfalls ein pessimistisches Bild und bestätigen die schlechten Erfahrungen mit der Monotherapie (1, 62, 92, 111, 121, 122, 146, 194, 214). Die Kombination Nephrektomie-Radiato-Chemotherapie hat keine Prognoseverbesserung gegenüber der Nephrektomie und der Bestrahlung erbracht (11, 201, 205).

Die Immuntherapie des Nierenkarzinoms unterscheidet eine adjuvante Immuntherapie vom Typ A (unspezifische Immunstimulation) und eine adoptive spezifische Immuntherapie vom Typ B (105).

Zum Typ A gehören therapeutische Versuche mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin). MORALES (141) behandelte 10 Patienten durch BCG-Stimulation und beobachtete, daß die vor dieser Behandlung negativen Hauttests (DNCB und Recallantigen) positiv wurden. Knochemmetastasen sprachen nicht auf diese Therapie an, während Lungenmetastasen zurückgingen. MINTON (137) verabreichte 9 Patienten wöchentlich einmal intradermal BCG. Bei 3 von 9 Patienten wurden die Metastasen nicht größer und in einem Fall gingen multiple Lungenmetastasen vollständig zurück. Diese Remission dauert noch nach 4 Jahren an.

MONTIE (138) erreichte bei 10 Patienten mit multiplen Metastasen durch die Gabe des sog. Transferfaktors, einem Polypeptid, eine vorübergehende Stabilisierung der Metastasen bei 3 von 10 Patienten.

Zum Typ B (adoptive spezifische Immuntherapie) zählt das Experiment von FENLEY (zit. bei 105), der sensibilisierte Lymphozyten von tumorspezifisch immunisierten Schweinen in die den Tumor versorgende Arterie infundierte. Bei 17 von 26 Patienten kam es zu Tumornekrosen.

SKINNER (186) berichtet anhand von 3 Fällen über gute Ergebnisse dieser spezifischen Immuntherapie beim fortgeschrittenen hypernephroiden Nierenkarzinom mittels xenogener Hyperimmun-RNA (Ribonucleinsäure). Dabei wird

ein Widder durch autochthone Tumorzellen, versetzt mit einem Immunpotentiator (BCG, Freunds Adjuvants), über einen längeren Zeitraum immunisiert und dessen Lymphknoten- und Milz-RNA (Ribonucleinsäure) gewonnen. Dieser sog. xenogene RNA-Extrakt wurde Patienten wöchentlich intrakutan injiziert; Zytotoxizitätsassays zeigten danach, wie die Fähigkeit der Lymphozyten des so immunisierten Patienten hypernephroide Nierenkarzinomzellen zu zerstören zunahm, d.h. der Lymphozytenkiller-Index (105) anstieg. Ob diese Lymphozytenstimulation durch die angeblich spezifische Immun-RNA oder durch den unspezifischen Reiz der injizierten xenogenen RNA bewirkt wird, bleibt aber unklar.

Abschließend muß festgehalten werden, daß z.Zt. die Immuntherapie am Beginn der theoretischen und klinischen Forschung steht; ihr therapeutischer Wert ist nach dem derzeitigen Wissen kaum beurteilbar.

II. 1.2. Hormontherapie

Die in der Hormontherapie des Nierenkarzinoms erprobten Substanzen sind das Gestagen Medroxyprogesteronacetat (Clinovir^{R}, Provera^{R}), Testosteronpropionat als Androgen, Corticosteroide und in einigen Fällen das Östrogen Stilböstrol (20, 131, 149, 180, 193, 206, 209).

Die größte Erfahrung auf dem Gebiet der Hormontherapie besitzt BLOOM (13 - 24). Nach der Tumornephrektomie

behandelte er 79 Patienten, welche z.T. multiple Metastasen aufwiesen mit Clinovir^{R}, 300 - 400 mg/die (20). In 55 % der Fälle berichtete er über eine subjektive Befundbesserung im Sinne einer Gewichtszunahme, gesteigerten Appetits und allgemeinem Wohlbefinden. Zwei bis sechs Wochen nach Beginn der Hormontherapie konnte er bei 16 % der Patienten im Röntgenbild einen meßbaren Rückgang der Metastasen verzeichnen. Bei Männern (21 %) trat dies häufiger auf als bei Frauen (8 %). In zwei weiteren Fällen blieben Metastasen bei deutlich verbessertem Allgemeinzustand stationär. Die Gestagentherapie schien bei zwei Patienten das Tumorwachstum zu beschleunigen; ihr Allgemeinzustand verschlecherte sich ebenfalls. In solchen Fällen und bei Therapieresistenz des Hormons während der ersten 8 Wochen wechselte Bloom auf die Androgentherapie über. Der Autor empfiehlt den Versuch einer Hormontherapie aus folgenden Gründen:

1) Die Tumorerzeugung durch Östrogene im Tierexperiment sowie die Inhibierung des Tumorwachstums durch Östrogenantagonisten ist bewiesen (103, 104, 193).

2) Hormone üben einen direkten inhibitorischen Effekt auf menschliche Nierenkarzinomgewebekulturen aus (42, 195).

Obwohl die Hormontherapie bei nur einem von fünf oder sechs Patienten erfolgreich ist, schafft diese Behandlung nach Meinung BLOOM's die Möglichkeit, selbst schwerkranken Patienten auch in hohem Alter das Leben erträglicher zu gestalten

und u.U. eine Lebensverlängerung von 2 - 3 Jahren zu bewirken.

Auch andere Kliniken erprobten nach den positiven Erfahrungen von BLOOM die Hormontherapie. WAGLE (206) behandelte 43 Patienten mit Depo-Clinovir^{R} bzw. Testosteronpropionat oder einer Kombination aus Clinovir^{R} und Prednison. Bei einem Teil dieser Patienten lag bereits eine diffuse Filialisierung vor. In 18 % der Fälle war klinisch und radiologisch eine Besserung des Allgemeinzustandes bzw. ein Rückgang von Metastasen zu beobachten. Nebenwirkungen der Hormontherapie wurden nicht beobachtet. Über die Zeitdauer des Therapieerfolges wurden keine Angaben gemacht.

Von 15 oral mit Clinovir^{R} behandelten Patienten sah PAINE (149) zwei Monate nach Therapiebeginn in 2 Fällen eine objektive Remission (13 %). In einem Fall wurde die Schrumpfung des Primärtumors registriert, bei einem zweiten Patienten konnte neben der Verkleinerung von Lungenmetastasen die Rückbildung eines Pleuraergusses beobachtet werden. Während der Hormontherapie bildeten sich jedoch auch neue Metastasen in der Lunge und im Knochensystem. Der Autor hält die Hormontherapie insbesondere bei Weichteilmetastasierung für gerechtfertigt. Wenn nach 3-monatiger Behandlung weder subjektiv noch objektiv ein Therapieerfolg zu verzeichnen war, wurde das Medikament abgesetzt. JAKOUBKOVA

(94) konnte bei 3 Patienten nach Hormontherapie und Radiatio eine Rekalzifizierung von Knochenmetastasen feststellen.

Den Therapieerfolg (objektive Metastasenrückbildung) nach Hormontherapie mit Medroxyprogesteronacetat und/oder Testosteronpropionat gibt die Literatur bis 1971 mit 12 - 25 % an (20, 131, 149, 180, 193, 213).

Nach 1971 wird dagegen zurückhaltender über die therapeutische Wirksamkeit von Hormonen berichtet. OBRECHT (1973, 146) zitiert eine klinische Studie der Schweizerischen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK), in der die Wertlosigkeit dieser Therapie festgestellt wird. ALBERTO und SENN (1974, 1) sahen keinen Wert in der Hormontherapie.

PETERSON (1974, 154) konnte bei 14 hormonbehandelten Kranken in 3 Fällen eine meßbare Verkleinerung von Lungenmetastasen röntgenologisch feststellen. Mit einer Hormonbehandlung betrug die Überlebenszeit seiner Patienten nach Feststellung von Metastasen 19 Monate, ohne Hormontherapie überlebten die Kranken nur 9,6 Monate ihr Leiden länger.

CUMMINGS (1977, 50) untersuchte den Einfluß von Clinovir^{R} auf Tumorgewebekulturen eines Patienten, dessen Primärtumor nach Gabe von Clinovir^{R} schrumpfte. Er konnte keinen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum feststellen.

VON LIEVEN (119) sah 1977 bei 15 Gestagen-behandelten Patienten in 5 Fällen verlangsamtes Metastasenwachstum bzw. stationäres oder regredientes Verhalten. Eine vollständige Rückbildung wurde nicht gesehen. MORALES (1975, 140) konnte bei mit Clinovir^{R} behandelten Patienten nur eine subjektive Besserung beobachten, während bei einem Patienten die Androgentherapie für 2,5 Monate zu einem Rückgang der Lungenmetastasen führte.

Neben einem meßbaren Rückgang von Metastasen bzw. Primärtumor führt die Hormontherapie zu subjektem Wohlbefinden, gesteigertem Appetit und Gewichtszunahme.
Nebenwirkungen in Form von Kopfschmerzen, Ödem- und Thromboembolieneigung sind beschrieben worden (20).

Nach HRUSHESKY (1977, 92) muß man bei der Wertung der Hormontherapie des Nierenkarzinoms zwischen klinischen Berichten bis 1971 und solchen nach diesem Datum unterscheiden. Der frühere Enthusiasmus über diese neue Therapiemöglichkeit ist nach 1971 gedämpft worden. Dennoch wird in einigen Fällen glaubhaft sowohl über subjektive Befundbesserung als auch über meßbaren Metastasenrückgang nach Hormontherapie berichtet. In der Beurteilung des Therapieerfolges fehlt allerdings häufig die klare Trennung zwischen dem subjektiven neuen Wohlbefinden der Patienten

und meßbarem Metastasenrückgang. Die sogenannten objektiven Kriterien eines Therapieerfolges sind meist ungenau definiert. In den wenigsten Fällen bedeutet objektive Rückbildung einen meßbaren Metastasenschwund von mehr als 50 % aller Metastasen bzw. Rückgang einer Metastase um die Hälfte, wie dies von der WHO (World Health Organisation) gefordert wird.

Die Tatsache, daß widersprüchliche klinisch-empirische Daten über den Wert einer Hormontherapie des menschlichen metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinoms existieren, hat zu der Frage geführt, ob auf molekularbiologischer Basis Hinweise für eine direkte wachstumshemmende Wirkung von Steroidhormonen (Gestagene, Glucocorticoide, Androgene) auf die Nierenkarzinomzelle bestehen.

II. 2. Molekularbiologische Wirkung der Steroidhormone

Die tierexperimentelle Erzeugung von Nierenkarzinomen durch prolongierte Östrogengabe und die klinische Empirie einer Therapiemöglichkeit des hypernephroiden Nierenkarzinoms durch Steroidhormone stellt die Frage nach der biologischen Wirksamkeit bzw. dem Wirkungsmechanismus dieser Hormone im menschlichen Nierentumorgewebe.

Nachdem es JENSEN 1960 (95) gelang, durch katalytische Reduktion von 6,7-Dehydro-östradiol-17ß in trägerfreiem

Tritiumgas [^{3}H]-Östradiol-17ß mit einer spezifischen Aktivität von 50 Ci/m mol darzustellen, konnte der Weg der Hormone durch in vivo Gaben verfolgt werden.

Die heutigen Hypothesen einer Hormonwirkung gehen davon aus, daß das Hormon in einem Erfolgsorgan an einen Rezeptor gebunden wird. Ein Hormonrezeptor muß ganz bestimmte Charakteristika aufweisen, die ihn von einem unspezifischen Hormonbinder unterscheiden:

1) hohe Affinität für das Hormon
2) begrenzte Kapazität
3) hohe Spezifität
4) Translozierbarkeit
5) Reaktion an der DNA.

Stellvertretend für andere Steroidhormone sei am Beispiel des Östrogens die Rezeptortheorie erläutert, wie sie in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist (212).

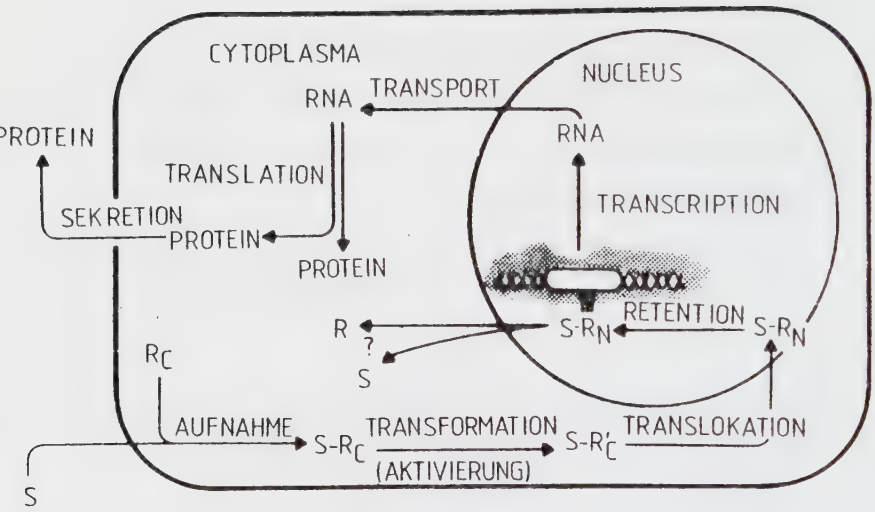

Abbildung 1: Schritte im molekularen Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.

Dabei werden die Östrogene (S) vor ihrer intrazellulären Wirkung an spezifische cytoplasmatische Rezeptoren gebunden (Rc) (RASPE, 162, O'MALLEY, 126) und bilden damit den Hormonrezeptorkomplex (S · Rc). Daneben erfolgt aber auch eine Bindung an eine Vielzahl anderer cytosolischer Proteine; diese Bindung bezeichnet man als unspezifische Bindung. Von den meisten Untersuchungsgruppen (95) wird angenommen, daß die Zellmembran des Erfolgsorgans

keine Barriere für die Östrogene darstellt. Zur Zeit ist allerdings noch nicht sicher abgeklärt. ob die Steroide über ein Transportprotein oder durch freie Diffusion in das Cytoplasma der Zelle gelangen. In einigen Fällen weist der Transfer durch die Zellmembran die Kinetik einer erleichterten Diffusion auf (199). Der mit 17ß-Östradiol beladene cytoplasmatische Hormonrezeptor (S · Rc) wird in einer temperaturabhängigen Reaktion aktiviert (88). Dieser transformierte Komplex wandert in den Zellkern (S · RN , Translokation), wo er im Chromatin des Zellkerns an einen Akzeptor gebunden wird. Nachdem der nukleare Hormonrezeptorkomplex im Kern der Zelle des Erfolgsorgans seine Wirkung hervorgerufen hat (Modulation der Genaktivität) wird er eliminiert. Die näheren Umstände der Eliminierung sind bis heute noch nicht abgeklärt.

II. 3. Nachweismöglichkeiten des Hormonrezeptors

Ein einfaches, für die Routine geeignetes Verfahren um den cytoplasmatischen Rezeptor aus einer Zelle zu extrahieren und anzureichern, ist die von KORENMAN (112, 113) beschriebene Methode, bei der die Rezeptoren aus Gewebehomogenat durch Zentrifugation bei 105 000 x g konzentriert werden. Der Überstand aus dieser Zentrifugation (Cytosol) wird zur Rezeptortitration verwendet.

In Parallelansätzen wird einerseits das Cytosol nur mit steigenden Konzentrationen tritiierten Hormons, zur Bestimmung der Totalbindungsfähigkeit andererseits ein 100 - 1000-facher Überschuß nicht radioaktiv markierten Hormons zusätzlich inkubiert. Die Differenz zwischen spezifischer Bindung (tritiiertes Hormon allein) und unspezifischer Totalbindungsfähigkeit (tritiiertes Hormon und unmarkiertes Hormon im Überschuß) ergibt die rezeptorspezifische Bindung. Bei diesen Versuchsansätzen liegen nach dem Massenwirkungsgesetz Hormone in freier Form vor. Um diese zu entfernen, werden sie nach der KORENMAN -Methode (112, 113) durch Adsorption an Aktivkohle (Dextrankohle-Methode) gebunden und eliminiert. Um das Adsorptionsvermögen der Kohle für Proteine zu erniedrigen, wird die Aktivkohle mit Dextran beschichtet, um so ihre Affinität für hochmolekulare Substanzen zu verkleinern.

Die Bildung des Hormon-Rezeptorkomplexes ist eine reversible Reaktion und kann durch folgende Reaktionsgleichung wiedergegeben werden:

$$\text{Hormon} + \text{Rezeptor} \rightleftharpoons \text{Hormon-Rezeptorkomplex}$$

$$H + R \rightleftharpoons H - R$$

Die Assoziationskonstante K_A ergibt sich aus der Gleichung:

$$K_A = \frac{k + 1}{k - 1} = \frac{1}{K_D} = \frac{[RH]}{[R] \times [H]} = \frac{[\text{Hormonrezeptor-Komplex}]}{[\text{freier Rezeptor}] \times [\text{freies Hormon}]}$$

Der Kehrwert von K_A (Assoziationskonstante) ist die K_D (Dissoziationskonstante). Die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer werden unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt.

Die Affinität des Hormons zum Rezeptor kann nun aus den bekannten Konzentrationen des zugesetzten tritiierten Hormons und der gemessenen Konzentration des gebildeten tritiierten Hormon-Rezeptorkomplexes bestimmt werden.

Die nachfolgend wiedergegebenen Gleichung von SCATCHARD (181) gilt in dieser Form nur unter der Voraussetzung, daß ein Hormonmolekül pro Rezeptor gebunden wird:

$$\frac{\text{gebundenes Hormon}}{\text{freies Hormon}} = \frac{1}{K_D} \times \text{gebundenes Hormon}$$

Trägt man den Quotienten aus den Konzentrationen des gebundenen Hormons/freiem Hormon (Ordinate) gegen die Konzentration an gebundenem Hormon (Abszisse) auf,

resultiert eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die Dissoziationskonstante K_D ist. Der Schnittpunkt mit der Abszisse gibt die maximale molare Bindungskapazität an.

Die Kompetitionsstudien geben einen Hinweis auf die Liganden-Spezifität der Bindungsstellen. Diese Spezifität kann dadurch geprüft werden, daß außer dem radioaktiven Hormon im in vitro Ansatz andere nicht markierte Steroidhormone dem Cytosolrezeptor im Überschuß angeboten werden.

Eine weitere Nachweismethode stellt die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation dar. Mittels dieses Verfahrens kann das Sedimentationsverhalten und damit auch angenähert das Molekulargewicht des Hormon-Rezeptorkomplexes bestimmt werden.

Der prinzipielle Nachteil der Gestagen-, Glucocorticoid- und Androgenrezeptorbestimmung liegt darin, daß an Serumkontaminationen, wie z.B. dem sexualbindenden Globulin (SHBG) und Transcortin gebundene Hormone dem Untersucher einen Hormon-Rezeptorkomplex eines Zielorgans vortäuschen können.

Das SHBG kann natürliche Androgene und Östrogene, Transcortin, Progesteron und natürliche Glucocorticoide, wie z.B. das Cortisol binden.

Die Gestagen-Rezeptorbestimmung mit R 5020, einem synthetischen Gestagen anstelle des Progesterons, schließen solche Rezeptor-Fehlbestimmungen aus, da das R 5020 nur an den Gestagenrezeptor bindet. In Analogie dazu führt der Einsatz von R 1881, einem synthetischen Androgen, im Vergleich zu Dihydrotestosteron und von Dexamethason für Cortisol zur exakten Androgen- bzw. Glucocorticoid-Rezeptoranalyse.

II. 4. Experimentelle Grundlagen der Hormontherapie

II. 4.1. Tierexperimentelle Erzeugung von Nierentumoren

MATTHEWS (130), KIRKHAM (103, 104) und STEGGLES (192) konnten nachweisen, daß sich durch prolongierte Östrogengabe beim Goldhamster Nierentumoren hervorrufen lassen, die transplantierbar waren und dem menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom ähnlich sind (87).

Die 1947 von MATTHEWS (130) durch subkutane Gabe von Stilböstrol hervorgerufenen Nierentumoren beim Goldhamster waren histologisch Nierenadenome und z.T. bilateral auftretende Nierenkarzinome, die vom proximalen Tubulusepithel ausgingen. Nach 7 Monaten imponierten sie als kleine kortikale Knoten und waren bei 75 % der Tiere nach 9 bis 12 Monaten in der Flanke palpabel.

Die Arbeiten von KIRKHAM (103, 104) über Östrogen-induzierte Nierentumoren, ebenfalls beim Goldhamster, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Die Tumorentstehung kann in einigen Fällen durch simultane Gabe von Testosteronpropionat, Desoxycorticosteronacetat oder Progesteron und Stilböstrol verhindert werden.

2) Bei weiblichen Hamstern konnten Nierentumoren erst nach Ovarektomie induziert werden.

3) Der Östrogen-induzierte Tumor ist transplantierbar und bleibt auch nach mehreren Transplantationen östrogenabhängig.

4) Wird der Tumor auf einen nicht östrogenvorbehandelten Wirt transplantiert, so wächst er nicht weiter. Erst nach mehreren Passagen in östrogenvorbehandelten Wirten setzt er sein Wachstum fort.

5) Das Tumorwachstum kann durch spätere Applikation von Progesteron oder Desoxycorticosteronacetat nur teilweise gehemmt werden.

6) Aufgrund der tierexperimentellen Erkenntnisse über die hormonelle Beeinflußbarkeit des Nierenkarzinoms

empfehlen die Autoren, Gestagene beim menschlichen metastasierenden Nierenkarzinom zu erproben.

Auch BLOOM (13 - 24) erforschte am Hamster-Tumor-Modell die Wirkung der Östrogenapplikation (16). Fünf Jahre nach serienmäßigen Transplantationen des Hamster-Nierentumors verlor dieser seine Östrogenabhängigkeit und wuchs schneller. Dosisabhängig konnte durch Cortison die Wachstumsgeschwindigkeit gedrosselt werden und durch gleichzeitige Gabe von Cortison und Medroxyprogesteronacetat total gehemmt werden. Dagegen konnten weder Medroxyprogesteronacetat noch Cortisol allein das Tumorwachstum aufhalten.

Die Wachstumsinhibition durch Cortison und Progesteron wies eine Spezifität gegenüber Nierenhamstertumoren auf, da eine Hemmung bei Tumoren mit anderer Organmanifestation nicht auftrat (13).

Der östrogeninduzierte Nierentumor des Goldhamsters muß nach Interpretation der geschilderten Versuche als hormonabhängiges Malignom eingestuft werden.

Der Nachweis östrogener Hormonrezeptoren verschiedener Tierspezies erklärte den biochemischen Wirkmechanismus auf molekularbiologischer Basis.

II. 4.2. Östrogenrezeptoren in der Niere verschiedener Tierspezies

LI und TALLEY (118) fanden 1974 im Nierencytosol von Goldhamstern, die nicht Östrogen-vorbehandelt waren, einen geringen Gehalt an Östradiol-Rezeptoren; im Nierencytosol kastrierter Ratten dagegen konnten sie keine Rezeptoren finden. Charakterisiert ist dieser Östrogenrezeptor durch einen Sedimentationskoeffizienten von 4 S im Saccharosedichtegrandienten. Progesteronrezeptoren konnten weder beim kastrierten noch normalen Hamster nachgewiesen werden.

STEGGLES und KING (191) fanden ebenfalls einen 4 S-Östrogenrezeptor im Nierencytosol männlicher Hamster, allerdings erst nach 9-monatiger Östradiolvorbehandlung. KING (102) konnte auch in der Rattenniere Östrogenrezeptoren nachweisen. Die Arbeitsgruppe BULLOCK konnte 1975 auch in der Niere der Maus Östrogenrezeptoren nachweisen (39).

Aufgrund der tierexperimentellen Untersuchungen lag es nahe, Östrogenrezeptoren in der normalen

menschlichen Niere und im menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom zu erforschen.

II.4.3. Östrogenrezeptoren in der menschlichen Niere und im menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom

In der Niere erwachsener Patienten konnten mittels Kohle-Adsorptionstechnik, Agargel-Elektrophorese und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation cytoplasmatische Makromoleküle nachgewiesen werden (29), die mit hoher Affinität und Hormonspezifität Östrogene binden und daher als Hormonrezeptoren betrachtet werden müssen. Da der initiale Schritt im Wirkungsmechanismus der Östrogene ihre Bindung an cytoplasmatische Hormonrezeptoren ist und diese Rezeptoren nur in Zielorganen für Östrogene gefunden werden (102), stellt der Nachweis solcher Rezeptormoleküle in der Niere des Menschen und im menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom ein gewichtiges Argument für die Hypothese eines direkten

Angriffspunktes der Östrogene im Stoffwechsel der Niere und des hypernephroiden Nierenkarzinoms dar.

Zusätzlich wurde der Frage einer möglichen Kompartimentierung des Östrogenrezeptors nachgegangen und der Rezeptorgehalt in Nierenrinde und Nierenmark untersucht (28). Es stellte sich heraus, daß die Mehrheit der Östrogenrezeptoren im Nierenmark zu finden ist. Diese Tatsache erhärtet die Hypothese, daß der Hauptangriffspunkt der Östrogene in den Sammelröhrchen und/oder in der Henleschen Schleife (aufsteigender Schenkel?) liegt. Der antinatriuretische Effekt der Östrogene in der Niere verschiedener Laboratoriumstiere (158) und des Menschen würde durch diese Befunde miterklärt.

Auch im menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom konnten 17ß-Östradiol-bindende Makromoleküle nachgewiesen werden (27). Da diese eine hohe Affinität für 17-ß-Östradiol, eine sehr begrenzte Kapazität und eine hohe Spezifität besitzen, sowie in den Kern der Zelle translozierbar sind, scheint es sich um Östrogenrezeptoren zu handeln (79, 100), wie sie bisher hauptsächlich in weiblichen Sexualorganen (Uteri verschiedener Spezies; 97, 189) nachgewiesen wurden.

III. Ziele der Arbeit

Die Tatsache, daß im Tierexperiment durch Östrogene Nierentumoren erzeugt werden können, die histologisch dem menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinom ähnlich sind (87, 103, 104, 130, 192), durch Steroidhormone in ihrem Wachstum gehemmt werden können (103, 104), der Nachweis von Östrogenrezeptoren im Nierenkarzinom des Menschen (27) und teilweise erfolgreiche klinische Versuche insbesondere durch das Gestagenderivat Medroxyprogesteronacetat (Clinovir^{R}) das Wachstum des Primärtumors und/oder das seiner Metastasen zum Stillstand zu bringen, haben nach der Existenz von Gestagen-, Glucocorticoid- und auch Androgenrezeptoren fragen lassen. Der Nachweis dieser Steroidhormonrezeptoren würde die z.T. positiven klinisch-empirischen Befunde stützen und es rechtfertigen, Steroidhormone bei Rezeptor-positivem Befund gezielt zur Therapie des metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinoms einzusetzen.

Das Gestagen Medroxyprogesteronacetat ist in der Nierenkarzinomtherapie das am meisten verwendete Steroidhormon. Der Wirkungsmechanismus, mit dem dieses zu einer Wachstumshemmung des Primärtumors bzw. seiner Metastasen führt, ist unbekannt. Die interessanteste Hypothese bei der Interpretation der

Hormonwirkung ist die Vorstellung einer direkten inhibitorischen Wachstumskontrolle der Karzinomzelle.

Es ist bekannt, daß Gestagenderivate und andere Steroidhormone ihren Reaktionsablauf durch Bindung an intrazelluläre cytoplasmatische Rezeptoren einleiten (199). Der Nachweis von Gestagenrezeptoren in einem Gewebe zeigt, daß dessen Wachstum und Entwicklung mit großer Wahrscheinlichkeit durch dieses Hormon bzw. verwandte Steroidhormone beeinflußt wird.

Die vorliegende Arbeit untersucht zuerst die Möglichkeit einer direkten zellulären Wirkung des Gestagens durch den Versuch, Gestagenrezeptoren nachzuweisen.

Da die Synthese des Progesteronrezeptors einerseits durch Östrogene induziert wird (199) und andererseits im Nierenkarzinom des Menschen Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden konnten (27), wurde bei einer begrenzten Anzahl von Patienten vor der geplanten Tumornephrektomie eine Östrogenvorbehandlung mit unterschiedlicher Dosierung eingeleitet.

Mit dieser Maßnahme sollte die Antwort auf zwei Fragen gefunden werden:

1. Kann eine Östrogenbehandlung zu einer Induktion der R 5020-Bindungssynthese führen und handelt es sich demzufolge um echte Progesteronrezeptoren.

2. Führt die Erhöhung der R 5020-Binder zur besseren Charakterisierung dieser Hormonrezeptoren.

Da erst kürzlich von SLOWMAN (188) Inhibitoren von Glucocorticoidrezeptoren bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie festgestellt wurden, erfolgten im Rahmen der Gestagen-Rezeptoranalysen Untersuchungen, die dem Nachweis von Inhibitoren der R 5020-Bindung dienten.

Obwohl es bei in vitro-Versuchen keine eindeutigen Hinweise für eine Hormonabhängigkeit des menschlichen Nierenkarzinoms gibt, existieren Berichte, die darauf hindeuten, daß Glucocorticoide das Wachstum von Nierenkarzinomgewebe in vitro stimulieren können (42, 105). Zudem ist bekannt, daß Progesteron an den Glucocorticoidrezeptor binden kann und dabei die biologische Aktivität der Glucocorticoidhormone vermindert (199). Untersucht wurde deshalb, ob im Nierenkarzinom des Menschen Glucocorticoidrezeptoren existieren und ob eine mögliche Kreuzreaktion mit Medroxyprogesteronacetat, dem wirksamen Agens in der Hormontherapie, besteht.

Obgleich die Niere im allgemeinen nicht als Zielorgan androgener Hormone bekannt ist, sind spezifisch renale Rezeptoren für androgene Hormone entdeckt worden (32).

Darüber hinaus ist bekannt, daß Androgene die Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen in der Niere kastrierter Tiere induzieren (108, 109, 114).

Der Einfluß androgener Hormone auf die normale Niere hat nach der Bedeutung dieser Hormone für das hypernephroide Nierenkarzinom fragen lassen, nicht zuletzt, weil ein indirekter Hinweis auf dessen mögliche androgene Beeinflussung in der typischen Geschlechtsverteilung (Männer : Frauen, etwa 2 : 1) besteht. Außerdem wurden Androgene neben Gestagenderivaten in der Hormontherapie des Nierenkarzinoms eingesetzt (16, 146). Diese Überlegungen veranlaßten Tumorcytosoluntersuchungen mit dem synthetischen Androgen R 1881.

Neben den genannten Hormonrezeptoruntersuchungen im Tumorcytosol wurde versucht, direkte Analysen der Hormonempfindlichkeit an menschlichen Nierenkarzinomzellen in vitro durchzuführen. Dazu war es notwendig, zunächst ein Verfahren zur enzymatischen Isolierung von intakten stoffwechselaktiven Tumorzellen zu entwickeln.

Progesteron- und Glucocorticoid-Rezeptoranalysen wurden danach auch bei intakten, enzymatisch isolierten, stoffwechselaktiven Tumorzellen untersucht.

Ausgehend von der Vorstellung, daß Steroidhormone das Tumorwachstum beeinflussen können, wurde deren Einfluß auf die Proteinsynthese von vitalen enzymatisch isolierten Nierenkarzinomzellen analysiert. In Abwesenheit von 17ß-Östradiol und/oder Progesteron wurde die Einbaurate von radioaktiv markiertem Leucin gemessen.

Das Arbeitsprogramm wies die folgenden Schwerpunkte auf:

1) Nachweis und Charakterisierung von Gestagen-, Glucocorticoid- und Androgenrezeptoren im Tumorcytosol.

2) Versuche zum Nachweis möglicher Inhibitoren der Gestagenbindung im Tumorcytosol.

3) Isolierung von intakten stoffwechselaktiven menschlichen Nierenkarzinomzellen.

4) Untersuchung der Gestagen- und Glucocorticoidbindung durch vitale enzymatisch isolierte Tumorzellen.

5) Untersuchungen über den Einfluß von Steroidhormonen auf die Proteinsyntheseraten isolierter vitaler Tumorzellen.

IV. Gestagen-, Glucocorticoid- und Androgenrezeptoranalysen im hypernephroiden Nierenkarzinom des Menschen

IV. 1. Material und Methoden

IV. 1a. Material

IV. 1a.1. Chemikalien

IV. 1a.1.1. Radioaktiv markierte Verbindungen

1. R 5020 [6,7 - ^{3}H] 17,21-Dimethyl-19-norpregna-4,9-dien-3,20-dion. (87 Ci/mmol).
   Hersteller: Roussel-Uclaf, Romainville, Frankreich.
2. [1 (2)-^{3}H] -Dexamethason (23 Ci/mmol).
   Hersteller: New England Nuclear.
3. R 1881 (Methyltrienolone, [17 α-methyl-^{3}H] -; 87 Ci./mmol.
4. [U-^{14}C] -Leucin (0.345 Ci/mmol).
   Hersteller: Amersham Buchler.

Die Reinheit der Präparate wurde wöchentlich durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf

Merck Kieselgel 60 Fertigplatten in Chloroform/ Äthylacetat (4 : 1) und anschließende Auswertung mit einem BF-Scanner, Typ LB 2721, überprüft.

IV. la.1.2. Chemikalien mit hormoneller Wirkung

R 1881, R 5020, Dexamethason, 17ß-Östradiol, Progesteron, Aldosteron, Cortisol, Dihydrotestosteron und Medroxyprogesteronacetat.
Hersteller: Calbiochem, Upjohn.

IV. la.1.3. Spezielle Chemikalien:

1. Biofluor
   Hersteller: New England Nuclear.

2. Dextran T 500
   Hersteller: Pharmacia.

3. Kollagenase (E.C. 3.4.24.3)
   Hersteller: Serva Heidelberg.

4. Dimilume-30, Soluene-350
   Hersteller: Packard Instrument.

5. Norit A
   Hersteller: Serva.

6. Rinderserumalbumin, Agar purum
   Hersteller: Behringwerke.

7. Tris-HCl, (Tris- [hydroxymethyl])-amino-methanhydrochlorid
   Hersteller: Serva.

8. Triton X 100
   Hersteller: Packard Instrument.

9. Trypanblau (4 g / l in 0.9 %iger NaCl)
   Hersteller: Gibco.

10. Minimum Essential Medium
    Hersteller: Firma Flow Laboratories, Bonn
    (modifiziert) mit Earle Salzen.

11. Medium 199 (142).

IV. 1a.1.4. Weitere Chemikalien:

Alle übrigen Chemikalien und Reagenzien, die verwandt wurden, entsprachen der Klassifikation p.A. und wurden von Merck, Darmstadt, geliefert.

IV. 1a.2. Organe

IV. 1a.2.1. Hypernephroide Nierenkarzinome

Durch die Mitarbeit der eingangs erwähnten 14 Kliniken in Nordrhein-Westfalen war es möglich, eine umfangreiche Tumormaterial-Sammlung anzulegen.

Präoperativ erfolgte weder eine Bestrahlung noch eine zytostatische Therapie. In einigen Fällen wurden die Patienten mit Östrogenpräparaten vorbehandelt. Für die Rezeptoranalysen stand immer eine Nierentumorhälfte zur Verfügung; diese wurde entweder in Krebs-Ringer Phosphat-Puffer (KREBS 116) während der Transportzeit von maximal 1 h gelagert und durch handelsübliche Kühlaggregate auf $3^{\circ}C$ gekühlt oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Rezeptorstudien wurden nur an histologisch gesicherten hypernephroiden Nierenkarzinomen durchgeführt. Das Tumormaterial wurde, wie unter Methoden beschrieben, entweder sofort weiter verarbeitet oder für nachfolgende Analysen in flüssigem Stickstoff gelagert.

IV. 1a.2.2. Uteri

Uterusmaterial von Frauen in der Postmenopause, bei denen eine Gebärmutterextirpation wegen

eines Prolapses notwendig wurde, stellte die Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf (Dir. Prof. Dr. L. Beck) zur Verfügung.

IV. 1b. Methoden

IV. 1b.1. Rezeptoranalysen im Tumorcytosol

IV. 1b.1.1. Cytosolpräparation

Sofort nach Tumornephrektomie wurde Tumormaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Kleine Tumorstücke (3 - 6 g), die in flüssigem Stickstoff lagerten, wurden in eiskaltem Tris-Puffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l Na_2 EDTA, 10 mmol/l Monothioglycerol, 250 mmol/l Saccharose, pH 7,4) oder Tris-Puffer B (10 mmol/l Tris-HCl, 1.5 mmol/l Na_2 EDTA, 10 mmol/l Monothioglycerol pH 7.4) bei 3 - 4° C bis zum Auftauen aufbewahrt. Sie wurden dann mit der Schere zerkleinert und danach 10 min lang im selben Medium (1 : 10, w/v) gewaschen, um sie von kontaminierendem Blut zu befreien. Anschließend erfolgte die Homogenisation der gewaschenen Tumorgewebestücke mit einem Dual-Homogenisator in kaltem Tris-Puffer A oder B (1 : 6, w/v).

Schließlich wurde das Homogenat bei 105 000 g (3^{o} C) 45 min zentrifugiert und der Überstand, das Cytosol, abpipettiert.

In Analogie zu diesem Verfahren erfolgte die Tumorcytosolpräparation auch für die Glucocorticoid- und Androgen-Rezeptorbestimmungen.

IV. 1b.1.2. Gestagen- Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen nicht Östrogen-vorbehandelter Patienten

Untersucht wurden insgesamt 88 hypernephroide Nierenkarzinome. In 20 Fällen wurden verschiedene Areale eines Tumors analysiert. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 57 Jahre, der jüngste Patient war 41 Jahre, der älteste 78 Jahre. Das Verhältnis Männer/Frauen war 75 zu 30. Die Dauer der warmen Ischämie (Zeitpunkt vom Abklemmen des Nierenstiels bis zur Lagerung in flüssigem Stickstoff) betrug im allgemeinen 5 - 20 Minuten.

IV. 1b.1.2a Bindungsaffinität und -kapazität

Für die Scatchard-Analysen wurden in Vierfachansätzen jeweils 200 µl Cytosol mit steigenden

Konzentrationen (2 - 75 nmol/l) tritiiertem R 5020 versetzt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des radioaktiv-markierten Hormons wurde die Hälfte der Reaktionsansätze zusätzlich mit 1 µmol/l nicht-tritiiertem R 5020 beladen. Danach erfolgte mit Hilfe der Dextrankohle-Methode, welche eine Modifikation der von KORENMAN (112) entwickelten Methode darstellt, das weitere methodische Vorgehen, indem nach 4-stündiger Inkubation zu den Ansätzen jeweils 5 g/l Norit A, 0,5 g/l Dextran T 500, 10 mmol/l Tris-HCl, 1,5 mmol/l Na_2 EDTA, 10 mmol Monothioglycerol und 250 mmol/l Glucose (pH 7.4) zugesetzt wurden. Die Ansätze wurden bei 0 - 3° C 10 min inkubiert und danach 2 min bei 12 000 x g in einer Eppendorf-Zentrifuge, Modell 3200, zentrifugiert. 0.2 ml Portionen des Überstandes wurden zusammen mit 10 ml Biofluor in Szintillationsgefäße pipettiert und die proteingebundene Radioaktivität in einem Tri-Carb 2424 Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard Instrument) gezählt.

Die Differenz zwischen der totalen Bindung von $[^3H]$ R 5020 (in Abwesenheit nicht-tritiierten Hormons) und der unspezifischen $[^3H]$ R 5020-Bindung (in Anwesenheit nicht-tritiierten Hormons) wurde als rezeptorspezifische Bindung betrachtet. Anhand dieser spezifischen $[^3H]$

R 5020-Bindung wurde die scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) des Hormonrezeptorkomplexes und die maximale Bindungskapazität der Cytosolpräparationen nach der Methode von SCATCHARD (181) ermittelt.

IV. 1b.1.2b. Hormonspezifität der Bindung

Zur Untersuchung der Hormonspezifität der R 5020-Bindung wurden Kompetitionsanalysen mit Hilfe der Dextrankohlen-Methode durchgeführt. Dieses Verfahren stellt eine Modifikation (27) der von KORENMAN (113) inaugurierten Methode dar. Dazu wurde das Cytosol (in 0.2 ml Portionen) hergestellt in Tris-Puffer A entweder nur mit [^{3}H] R 5020 (10 nmol/l, totale Bindung) oder in Gegenwart von nicht-markiertem Hormon (1 µmol/l, unspezifische Bindung) inkubiert. Die Details zu den einzelnen Versuchen gehen aus den Legenden zu den Abbildungen hervor. Nach der Inkubation erfolgte die weitere Analyse nach der Dextrankohle-Methode. Als Maß für die spezifische Bindung wurde die Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung

angesehen. Für Kompetitionsversuche wurden nicht-markierte Hormone wie Progesteron, 17ß-Östradiol, Cortisol, Aldosteron und Dihydrotestosteron verwandt.

IV. 1b,1. 2c. Dichtegradientenzentrifugation

Die Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde nach einer Modifikation (27) der von TOFT und GORSKI (198) entwickelten Analysetechnik durchgeführt. Jeweils 200 ul Cytosol wurden bei 0 - 3° C entweder mit 10 nmol/l [^{3}H] R 5020 allein (totale Bindung) oder zusammen mit 1 µmol/l nicht-tritiiertem Hormon (unspezifische Bindung) bei 0 - 3° C drei Stunden inkubiert. Jeweils 500 µl Volumina von 5 g/l Norit A, 0.5 g/l Dextran T 500, 10 mmol/l Tris-HCl, 1.5 mmol/l Na_2 EDTA, 10 mmol/l Monothioglycerol (pH von 7.4) wurden 2 min bei 12 000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das radioaktiv markierte Cytosol mit den Kohlepellets gemischt; die weitere Analyse erfolgte gemäß der Dextrankohle-Methode. Die Überstände wurden danach auf lineare

5 - 20 %ige Saccharosedichtegradienten (in Tris-Puffer B) aufgeschichtet. Die Gradienten wurden bei 0 - 3° C in einer Beckman - Ultrazentrifuge, Typ L 5 - 75, 16 Stunden mit einem Spinco SW 56 Titanschwingbecherrotor bei 56 000 U/min zentrifugiert.

Im Anschluß an die Zentrifugation wurden die Böden der Zentrifugenröhrchen durchstochen, Fraktionen zu 6 Tropfen in Szintillationsgefäße gesammelt und die Radioaktivität nach Zusatz von 10 ml Biofluor in einem Tri-Carb. 2425 gemessen.

IV. 1b. 1.3. Gestagen-Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen Östrogen-vorbehandelter Patienten

24 Patienten zwischen 40 und 87 Jahren wurden mit niedrigen und hohen Dosen Östrogen vorbehandelt. Keiner der Patienten wurde präoperativ bestrahlt oder cytostatisch behandelt. Patienten

mit Thromboseneigung wurden von der Östrogenbehandlung ausgeschlossen. Nebenwirkungen unter dieser "diagnostischen" Maßnahme konnten nicht beobachtet werden. Das methodische Vorgehen (IV. 1b. 1.3a und IV. 1b.1.3b.) entspricht den unter IV. 1b. 1.2a und IV. 1b. 1.2b geschilderten Verfahren.

IV. 1b.1.4. Inhibitoren der Gestagenbindung

Das für die Inhibitorstudie verwandte Tumormaterial stammte von 9 Patienten, 2 Männern und 7 Frauen.

Eine hochdosierte Östrogenvorbehandlung war präoperativ bei 2 Patientinnen erfolgt, 4 Patienten erhielten eine niedrige Östrogendosis. Bei 3 Patienten erfolgte keine Hormonbehandlung.

IV. 1b.1.4a Uteruscytosolherstellung

Kleine Uterusstücke (2 - 3 g), die in flüssigem Stickstoff lagerten, wurden bis zum Auftauen bei 0 - 3° C in Tris-Puffer A (1 : 6, w/v) aufbewahrt. Die grobe Zerkleinerung des Materials wurde mit einer Schere bei 0 - 3° C durchgeführt; die Feinzerkleinerung erfolgte in einem Dual 50 Zentrifugenglas mit einem Ultra-Thurrax (Firma Klees) bei

0 - 3° C. Danach wurde das Homogenat, wie unter IV. 1b.1.1. beschrieben, zentrifugiert.

IV. 1b.1.4b Inhibitoranalysen

Zur Bestimmung der rezeptorspezifischen R 5020-Bindung wurde das Tumorcytosol allein mit [^{3}H] R 5020 (totale Bindung) und in einem zweiten Ansatz zusammen mit einem Überschuß (1 µmol/l) unmarkiertem R 5020 (unspezifische Bindung) inkubiert. Die Differenz von totaler und unspezifischer Bindung ergab die rezeptorabhängige R 5020-Bindung. Diese wurde analog im Uteruscytosol festgestellt. Tumorcytosol und Uteruscytosol wurden danach in einem Verhältnis von 1 : 1 gemischt.

Aus den Meßdaten des getrennt analysierten Tumor- und Uteruscytosols wurde die theoretische Bindungskapazität für das Gemisch beider Cytosole (im Verhältnis 1 : 1) rechnerisch ermittelt. Dieser Wert wurde verglichen mit der Bindungskapazität, die für das Cytosolgemisch tatsächlich gemessen wurde.

Ein Abweichen der gemessenen Rezeptorkonzentration im Cytosolgemisch von der aus den

getrennten Analysen errechneten Konzentrationen wurde als Hinweis auf Bindungsinhibitoren aufgefaßt.

IV. 1b.1.5. Glucocorticoid-Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen

Das Tumorcytosol von 11 Patienten, 4 Männern und 7 Frauen zwischen 40 und 60 Jahren, wurde untersucht.

IV. 1b.1.5a. Bindungsaffinität und -kapazität

Das Prinzip dieser Methode ist bereits unter Punkt IV. 1b.1. 2a beschrieben worden. Es wurden steigende Mengen (1 - 20 nmol/l) [^{3}H]-Dexamethason eingesetzt. Weitere Details ergeben sich aus den Legenden zur Tabelle 4 und Abbildung 7.

IV. 1b.1.5b. Hormonspezifität der Bindung

Sie entspricht dem unter IV. 1b.1.2b beschriebenen Verfahren. Anstelle des [^{3}H] R 5020 wurde tritiiertes Dexamethason verwandt.

IV. 1b. 1.6. Androgen-Rezeptoranalysen in Tumorcytosolpräparationen

Das Tumorcytosol von 8 Nierenkarzinompatienten, 6 Männern und 2 Frauen, wurde untersucht. Das Durchschnittsalter war 64 Jahre.

IV. 1b.1.6a. Bindungsaffinität und -kapazität

Das Cytosol (0.2 ml Portionen) wurde mit steigenden Konzentrationen [^{3}H] R 1881 (0.5 - 21 nmol/l) 5 Std. lang bei 0 - 3^{o} C entweder allein oder in Gegenwart verschiedener kompetierender nicht markierter Steroidhormone (1 µmol/l) inkubiert. Weitere Einzelheiten der verschiedenen Ansätze gehen aus den Legenden zu den Abbildungen und der Tabelle hervor. Anhand der spezifischen [^{3}H] R 1881-Bindung wurde mit der Methode nach SCATCHARD (181) die scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) und die maximale Bindungskapazität errechnet.

IV. 1b.1.6b. Hormonspezifität der Bindung

Die Hormonspezifität der R 1881-Bindung wurde, wie unter IV. 1b.1.2b. beschrieben, untersucht.

Anstelle von $[^3H]$ R 5020 wurde $[^3H]$R 1881 eingesetzt. Für die Kompetitionsversuche wurden nicht markierte Hormone, wie Dihydrotestosteron, Östradiol und R 1881 eingesetzt.

IV. 1b. 2. Enzymatische Isolierung vitaler Tumorzellen

Die Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der Zellisolierung.

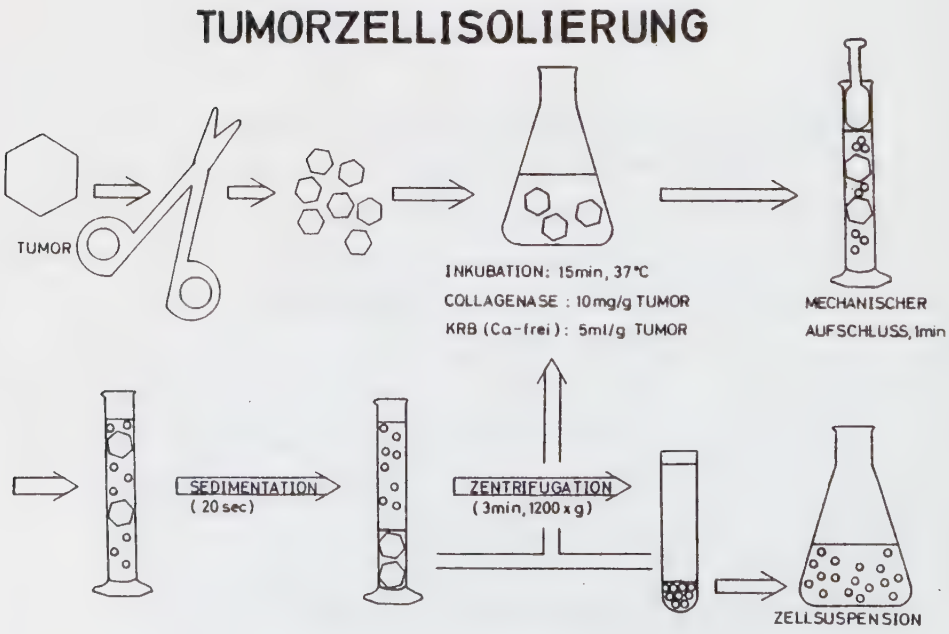

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Isolierung vitaler Tumorzellen.

Die in eiskaltem Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer gelagerten Tumorstücke wurden genauestens von nekrotischen und hämorrhagischen Arealen freipräpariert. 10 - 15 g des vorzerkleinerten Tumorgewebes wurden anschließend mit der Schere unter Kühlung in kleine Fragmente (ca. 1 mm Kantenlänge) zerlegt, in dem 5-fachen Volumen Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer, pH 7.4, ohne Calcium aufgenommen, mit Kollagenase (10 mg/g Tumorfeuchtgewicht) versetzt und nach Überführung in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Carbogen (95 Vol % O_2 5 Vol % CO_2) begast. Die Suspension wurde anschließend in einem Schüttelbad (Frequenz 120/min, Amplitude 2,5 cm) bei 37° C inkubiert. Nach 15 min wurde die Aufschwemmung in einem 100 ml Standzylinder mittels eines nur locker eingepaßten Pistills (Spiel ca. 700 µm) mechanisch weiter aufgeschlossen. Nach Sedimentation des nicht aufgeschlossenen Gewebes wurde der Überstand 3 min bei 1200 x g in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge, Typ Labofuge I, zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit dem 4-fachen Volumen (w/v) Minimum Essential Medium aufgenommen und bei 0° C unter intermittierendem Schütteln aufbewahrt. Im enzymhaltigen Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde dann das noch nicht aufgeschlossene Gewebsmaterial suspendiert und, wie aus Abbildung 2 ersichtlich, erneut dem Aufschlußverfahren unterworfen. Der Isolierungszyklus wurde zweimal wiederholt und die isolierten Zellen jeweils wie beschrieben in

Minimum Essential Medium überführt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen vereinigt, durch ein Nylongewebe (Maschenweite 150 µm) filtriert und zweimal mit Minimum Essential Medium in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge (s.o.) gewaschen. Das Zellsediment wurde anschließend gewogen, in dem 9-fachen Volumen Minimum Essential Medium suspendiert und bis zum Versuchsbeginn unter Eiskühlung aufbewahrt.

IV. 1b.3. Bestimmung der Viabilität enzymatisch isolierter Tumorzellen

Die Zellsuspension wurde verdünnt (1 : 10; w/v). Danach wurden 50 µl in eine Neubauer-Zählkammer zusammen mit 20 µl Trypanblaulösung gegeben. Nach 5 min wurden zuerst alle, dann die geschädigten, blau angefärbten Zellen ausgezählt (152).

Der prozentuale Anteil der intakten Zellen (= Viabilität) wurde berechnet nach:

$$\frac{\text{Gesamtzahl - Zahl der geschädigten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl.}} \times 100$$

IV. 1b.4. Vorbereitung der Tumorzellen zur Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Tumorzellen wurden nach der von DROCHMANS

(55) beschriebenen Methode aufgearbeitet und für die Elektronenmikroskopie in Epon eingebettet. Die Schnitte wurden anschließend mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop Typ EM 9 S, angefertigt.

IV. 1b. 5. Rezeptoranalysen und Hormonwirkungsstudien an vitalen enzymatisch isolierten Tumorzellen

IV. 1b.5.1. Bestimmung der Affinität und Kapazität der Gestagenbindung

Die Zellsuspensionen, die jeweils in 0.5 ml Portionen in Minimum Essential Medium präpariert wurden, inkubierten mit steigenden Konzentrationen (3 - 135 nmol/l) [^{3}H] R 5020 bei 37° C (totale Bindung). Paralleltitrationen in Anwesenheit von unmarkiertem R 5020 im Überschuß (1 µmol/l) erlaubten die Korrektur der Bindungsdaten durch den Betrag an unspezifischer Bindung. Weitere Details sind den Abbildungen 9 und 10 zu entnehmen.

IV. 1b. 5.2. Bestimmung der Affinität und Kapazität der Glucocorticoidbindung.

Einem konstanten Volumen (0.5 ml) enzymatisch isolierter unversehrter Tumorzellen wurden steigende Konzentrationen (6 - 65 nmol/l) [^{3}H] Dexamethason bei 37° C, 30 min lang zugesetzt (totale Bindung). In einem zweiten Ansatz wurde zu dem markierten Dexamethason ein Überschuß an kaltem Hormon zugesetzt (1 µmol/l), um aus der Differenz von totaler und unspezifischer Bindung die Dexamethason-rezeptorgebundene Menge zu errechnen.

IV. 1b. 5.3. Proteinsyntheseraten unter dem Einfluß von Steroidhormonen

Das Prinzip der Messung der Proteinsyntheseraten beruht darauf; daß Zellsuspensionen die angebotenen Aminosäuren in Proteine inkorporieren. Die Einbaurate einer radioaktiv markierten Aminosäure ist hierbei der Proteinsynthese proportional.

Sämtliche Aminosäuren mit Ausnahme von Leucin des Aminosäurengemisches nach EAGLE (59)

wurden in Krebs-Ringer Hydrogencarbonat-Puffer mit Calzium, enthaltend 11,0 mmol/l Glukose, gelöst.

500 µl dieses Aminosäurepuffers (pH 7.4) wurden zusammen mit 400 µl Tubulissuspension (1 : 10 w/v) in calciumhaltigen Krebs-Ringer-Hydrogencarbonat-Puffer in 20 ml Polyethylengefäße (Packard Instrument) gegeben, mit Carbogen begast und luftdicht verschlossen. Nach 3-stündiger Vorinkubation in einem Schüttelbad (Frequenz 120/min; Amplitude 2.5 cm) bei 37° C in An- bzw. Abwesenheit von 17ß-Östradiol bzw. Progesteron wurde der Inhalt der Glasröhrchen mit einer Pasteur-Pipette in Eppendorf-Gefäße abpipettiert, 5 sec. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurde das Pellet mit 1 ml Aminosäurepuffer suspendiert und in neue Glasröhrchen, in die zuvor erneut 17ß-Östradiol bzw. Progesteron 10 µl 10 nmol/l pipettiert worden war, überführt. Zu den nicht markierten Hormonen und den Proben ohne tritiiertes Hormon wurde außerdem 100 µl [^{14}C]-Leucin/ml 0.9 % NaCl (2.5 µCi) gegeben, mit Carbogen begast, luftdicht verschlossen und weitere 2 h im Schüttelbad bei 37° C inkubiert. Bei einem Teil der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 30 %iger $HClO_4$ (w/v) und 3 ml 0.6 n $HClO_4$ sowie 100 µl einer gesättigten Leucin-Lösung in Wasser sofort gestoppt (187). Diese mit Parafilm abgedichteten Proben wurden bei 0° C 12 h kühl gestellt.

Nach 2 h Inkubationszeit wurden bei den übrigen Proben durch Zugabe von 100 µl 30 % $HClO_4$ und 100 µl gesättigte Leucinlösung die Reaktion gestoppt und der Inhalt in Glaszentrifugenröhrchen überführt. Die Ansätze wurden mit Parafilm abgedichtet und bei einer Temperatur von 0^{o} C 12 h aufbewahrt.

Danach schloß sich ein Waschvorgang an: Nach Zugabe von jeweils 100 µl kaltem Leucin und 3 ml 0.6 n $HClO_4$ wurde das Pellet durch einen in das Glaszentrifugen-Röhrchen gestellten Glasstab auf einem Vibrator aufgewirbelt, um so nicht gebundenes [^{14}C]-Leucin zu eliminieren; nach Zugabe von 3 ml $HClO_4$ wurde das Pellet noch weiter aufgewirbelt. Danach wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 3000 U zentrifugiert. Die Glasröhrchen wurden nach der Zentrifugation bis dicht an das Pellet heran mit saugfähigem Papier gesäubert. Danach erfolgte die Wiederholung des gesamten Waschvorganges wie beschrieben dreimal. Anschließend wurde dem Pellet jeweils 200 µl aqua dest. zugegeben. Der Ansatz blieb nach leichtem Schütteln 15 - 20 min stehen; dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Soluen 350 und Verschluß der Ansätze mit Parafilm. Diese Ansätze wurden nach mehrfachem Aufschütteln 9 - 22 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Zählung der Radioaktivität wurden jeweils 500 ul des Reaktionsansatzes zusammen mit 10 ml Dimilume 30 in Szintillationsgefäße gegeben und die Radioaktivität in einem Tri-Carb gemessen.

Zur Auswertung wurden die Einbauraten des [^{14}C]-Leucin pro mg Protein berechnet.

IV. 1b.6. Proteinbestimmung von Cytosolen

Der Proteingehalt von Cytosolen wurde mittels einer modifizierten Folin-Ciocalteus-Reaktion (LOWRY, 123) durchgeführt. Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden steigende Mengen (0,2 - 1,0 ml) einer 0,01 %igen Rinderserumalbuminlösung mit Wasser auf 1,0 ml aufgefüllt, mit jeweils 0,5 ml Reaktionslösung bestehend aus 1 ml Na-Tatrat x 4 H_2O (4 %), 1 ml Cu SO_4 x 5 H_2O (2 %) und 98 ml Na_2CO_3 (4 %) in 0,2 n NaOH 10 min bei 20^{o} C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz hinzugegeben, weitere 30 min bei 20^{o} C inkubiert und dann gegen einen Leerwert, bestehend aus 1 ml Wasser, 0.5 ml Reaktionslösung und 0.1 Folin-Ciocalteus-Reagenz, der die gleiche Vorbehandlung erfahren hatte, bei 578 nm in einem Eppendorf-Fotometer, Typ 1101 M, gemessen und aus den so ermittelten Werten eine Eichkurve gezeichnet. Die gleiche Behandlung erfuhr 1 + 99 verdünntes Cytosol, von dem der Proteingehalt bestimmt werden sollte.

IV. 1b.7. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen

Der Proteingehalt von Zellsuspensionen wurde mittels des Biuret-Reagenz (171, 172, 209) bestimmt.

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden steigende Mengen (0,1 - 2,0 ml) einer 1 %igen Rinderserum-Albuminlösung mit 0.9 %iger NaCl-Lösung auf 2.5 ml verdünnt, mit jeweils 5 ml Biuret-Lösung auf 7.5 ml aufgefüllt, 30 min bei 30° C im Wasserbad inkubiert, gegen 2.5 ml 0.9 % NaCl zusammen mit 5,0 ml Biuret-Reagenz bei 546 nm in einem Eppendorf-Fotometer, Typ 1101 M, gemessen und aus dem so ermittelten Wert eine Eichkurve erstellt.

0.2 ml Zellsuspension wurden mit 0,5 ml 1 N NaOH 3 h bei 60° hydrolysiert, auf 20° C abgekühlt, mit 0.9 %iger NaCl-Lösung auf 2,5 ml verdünnt, mit 5 ml Biuret-Reagens versetzt und 30 min bei 30° C inkubiert. Die Messung wurde analog der Messung zur Aufstellung der Eichkurve durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

V.1. Steroidhormon-Rezeptoranalysen im Tumorcytosol

V.1a. Bindungsstudien mit dem synthetischen Gestagen R 5020 bei Östrogen-unvorbehandelten Patienten

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Gestagen-bindenden Molekülen im Nierenkarzinom des Menschen wurde das Tumorcytosol mit [^{3}H] R 5020 inkubiert und mit Hilfe von SCATCHARD-Analyse, Kompetitionsversuchen und der Dichtegradientenzentrifugation näher analysiert.

Hormonrezeptorbestimmungen mit radioaktiv markiertem Progesteron anstelle des synthetischen R 5020 haben den Nachteil, daß das Gestagenderivat auch an Transcortin bindet; hohe Gestagen-Rezeptorkonzentrationen könnten so vorgetäuscht werden.

R 5020, ein synthetisches Gestagen, hat den Vorteil, ausschließlich an den Gestagenrezeptor zu binden; eine Bindung an Transcortin, das infolge Serumkontamination des Tumorcytosols vorhanden sein kann, unterbleibt.

Zur Bestimmung der Affinität und Kapazität der [^{3}H] R 5020-Bindung wurden konstante Tumorcytosolvolumina (200 µl) mit steigenden Konzentrationen des tritiierten Hormons titriert. Paralleltitrationen in Gegenwart von 1 µmol/l unmarkiertem R 5020 erlaubten eine Korrektur der Bindungsdaten um den Anteil der unspezifischen Bindung, d.h. Bindung an verschiedene durch geringe Affinität und hohe Kapazität charakterisierte Nicht-Rezeptorproteine.

Die Titrationsversuche zeigten in der graphischen Darstellung bei Patienten, deren Tumorcytosol rezeptorähnliche Komponenten aufwies, Sättigungskurven. Die scheinbare Dissoziationskonstante des R 5020-Hormonrezeptorkomplexes und die maximale Anzahl der Bindungsstellen wurden mit Hilfe der SCATCHARD-Analyse (181) ermittelt. Die Abbildung 3 zeigt eine typische SCATCHARD-Analyse eines Nierenkarzinom-Patienten. Dabei wurde das Tumorcytosol (0.2 ml Portionen) in Tris-Puffer A hergestellt und mit 3.5-44 nmol/l [^{3}H] R 5020 bei 0 - 3° C entweder allein oder in Gegenwart von nichtmarkiertem R 5020 (1 µmol/l) inkubiert. Die Rezeptorbindung wurde mit Hilfe der Dextrankohle-Methode festgestellt.

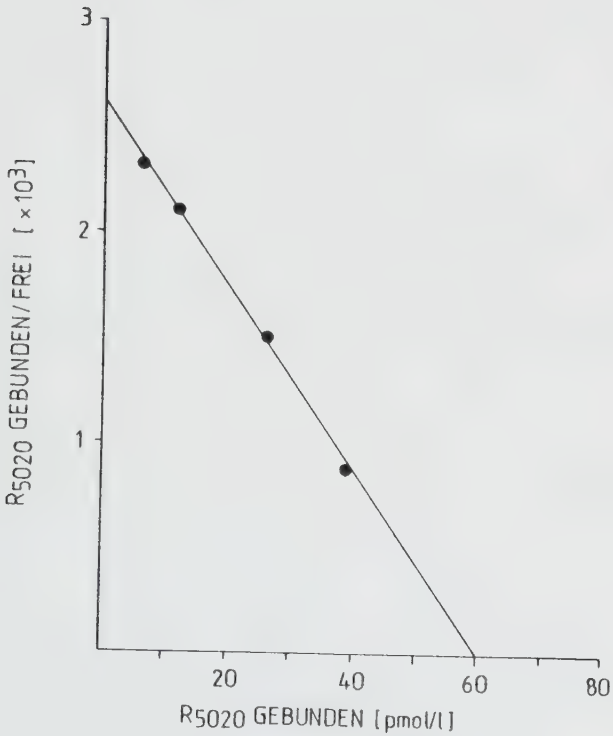

Abbildung 3: Repräsentative SCATCHARD-Analyse des Tumorcytosols von Patient M. (45 Jahre, männlich).

Nach Auftragung des Quotienten aus den Konzentrationen des spezifisch gebundenen zu freiem R 5020 (Ordinate) und des spezifisch gebundenen R 5020 (Abszisse) ergab sich aus der Verbindungslinie der Punkte eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) und deren Schnittpunkt mit der Abszisse ein Maß für die scheinbare Bindungskapazität (n) des R 5020-Rezeptorkomplexes darstellt.

Für die Reaktion: R 5020 + Rezeptor $\rightleftharpoons$ R 5020-Hormonrezeptorkomplex betrug die scheinbare Dissoziationskonstante $3.1 \pm 1.2 \times 10^{-8}$ mol/l.

Die Spezifität des R 5020-Hormonrezeptors wurde dadurch bestimmt, daß das Cytosol entweder nur mit [^{3}H] R 5020 (10 nmol/l, totale Bindung) oder in Gegenwart von nicht markierten Hormonen im Überschuß (1 µmol/l, unspezifische Bindung) inkubiert wurde. Als Maß der rezeptorspezifischen Bindung wurde die Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung angesehen. Als Kompetitoren wurden nicht tritiiertes Progesteron, 17ß-Östradiol, Cortisol, Aldosteron und Dihydrotestosteron eingesetzt.

Von 63 untersuchten Männern fanden sich bei 27 (43 %) und von 25 analysierten Frauen bei 10 Patientinnen (40 %) im Tumorcytosol R 5020-rezeptorähnliche Komponenten. Die Abbildung 4 faßt diese Befunde zusammen.

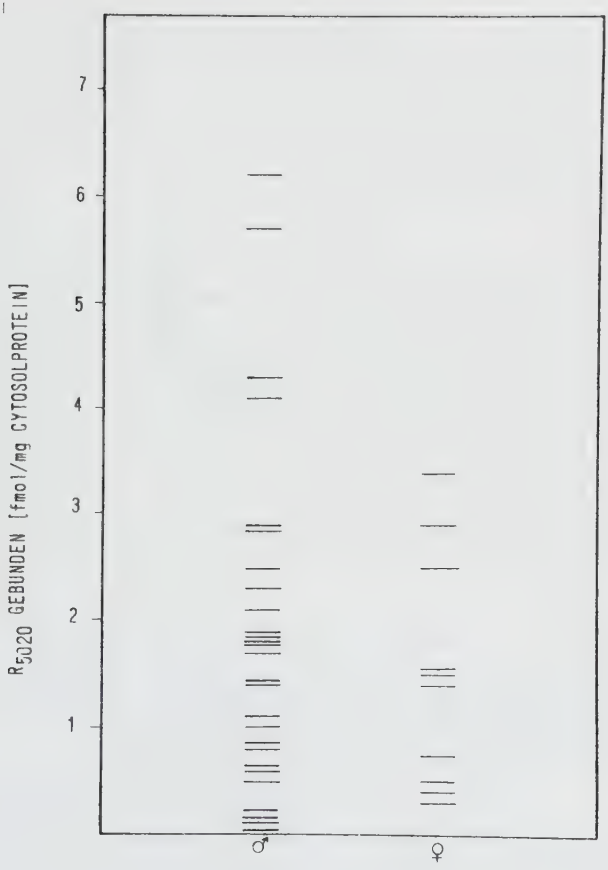

Abbildung 4: R 5020-rezeptorähnliche Komponenten im Tumorcytosol von 27 Männern und 10 Frauen.

Grundsätzlich lagen die Rezeptorspiegel niedrig. In 85 % der männlichen und 90 % der weiblichen Tumoren war die Bindungskapazität nicht größer als 3 fmol/mg Cytosolprotein.

Im Tumorcytosol von 18 der insgesamt 27 Männern überschritten die R 5020-Bindungskomponenten nicht die 2 fmol-Grenze. Auch bei 7 von 10 Patientinnen wurden Werte unter 2 fmol/mg Cytosolprotein gefunden. Die durchschnittliche Bindungskapazität bei Männern mit rezeptorähnlichen Komponenten lag bei 2.0 $\pm$ 2.1 fmol, diejenige bei den Frauen betrug 1.5 $\pm$ 1.1 fmol/mg Cytosolprotein.

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten S (SVEDBERG) des [^{3}H]R 5020-Binder wurde hormonbeladenen Cytosol (200 µl) auf lineare 5 - 20 % (w/v) Saccharose-Dichtegradienten in Tris-Puffer B aufgeschichtet und 16 h bei 56 000 U/min zentrifugiert, nachdem zuvor die Reaktion mit Hilfe der Dextrankohle-Methode gestoppt worden war. Die Abbildung 5 zeigt zwei repräsentative Sedimentationsprofile von Saccharose-Dichtegradientenversuche.

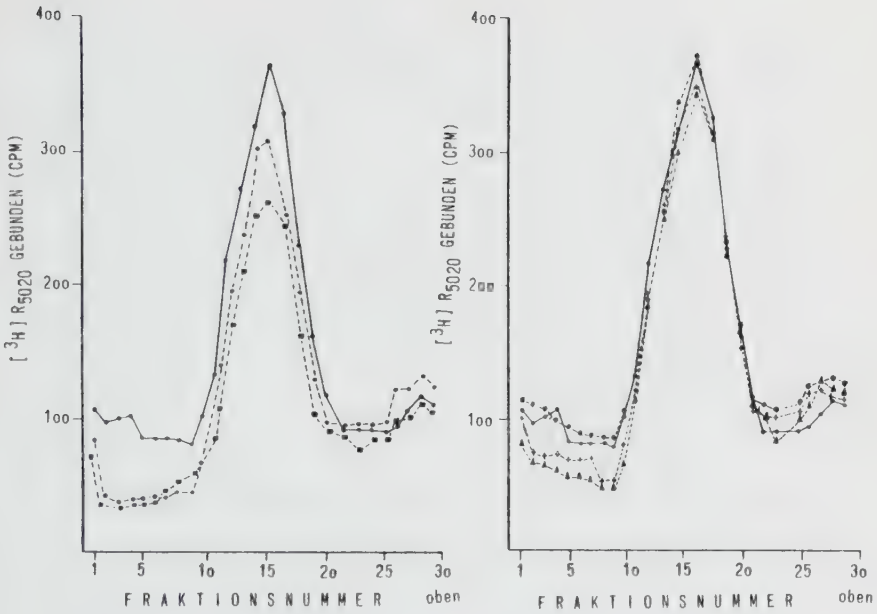

Abbildung 5: Repräsentative Sedimentationsprofile der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.

In beiden Graphiken stellt die obere Kurve (●——●) [^{3}H] R 5020 (10 nmol/l) dar, daß in vitro bei 0 - 3° C entweder allein oder in Gegenwart verschiedener kompetierender Hormone (1 umol/l) inkubiert wurde. Als unmarkierte Hormone wurden eingesetzt: ● ---- ● R 5020,

■ ---- ■ Progesteron, + ---- + 5 α Dihydrotestosteron,
▲ ---- ▲ 17ß-Östradiol and ✱ ---- ✱ Cortisol.

Die spezifische Bindung ergibt sich wiederum aus der Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung. Beide Isotopenprofile der Abbildung 5 zeigen, daß die spezifischen R 5020-Binder zum überwiegenden Teil an Makromoleküle binden, die in der 4 S-Region des Gradienten sedimentieren.

Zusätzlich wird deutlich, daß R 5020-bindende Komponenten eine beachtliche Selektivität für bestimmte Hormone aufweisen. Sowohl unmarkiertes R 5020 als auch Progesteron sind in der Lage, die Bindung von [^{3}H] R 5020 zu hemmen. Dagegen inhibieren 5α-Dihydrotestosteron, 17ß-Östradiol und Cortisol nur geringfügig die Bindungen von [^{3}H] R 5020.

V.1b. Bindungsstudien mit dem synthetischen Gestagen R 5020 bei Östrogen-vorbehandelten Patienten

Untersucht wurde das Tumorcytosol einer Gruppe Östrogen-niedrig dosierter und einer Gruppe Östrogen-hochdosierter Patienten. Die Tabelle 1 faßt solche Patienten, die vor der Tumornephrektomie niedrig mit Östrogen (Progynon^R) vorbehandelt wurden, zusammen.

Patienten, Alter, Geschlecht	Progynon^{R}-Depot (Östradiol-17-valeriarat) intramuskulär		Progynon^{R}-C (Äthinylöstradiol) 0.02 mg/Tabl oral		Progynon^{R}-M (Äthinylöstradiol) 0.2 mg/Tabl. oral		R_{5020}-Bindungskapazität (fmol/mg Cytosolprotein)	
	Dosierung	Tag	Dosierung	Tag	Dosierung	Tage	Einzelbestimmungen	Mittelwerte
1. P., 58 J. ♂	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			0.9 4.1	2.5
2. G., 60 J. ♀	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			0 0	0
3. E., 60 J. ♂	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			4.0 1.5	2.75
4. H., 40 J. ♂	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			1.3 6.3	3.8
5. Sch.,52 J. ♀	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			0	0
6. S., 64 J. ♂	10 mg	1.	3 x 1	2.-7.			0 1.0	0
7. G., 60 J. ♂					5 x 2	5	3.4 3.6	3.5
8. S., 50 J. ♂					5 x 2	5	5.2 1.4	3.3

Tabelle 1: Progesteronrezeptor-Spiegel bei 8 mit niedrigen Östrogendosen vorbehandelten Patienten.

Die Wirkung dieser Vorbehandlung bezüglich der R 5020-Bindungskapazität im Tumorcytosol wurde untersucht. Methodisch wurde dabei, wie unter V. 1a. bereits erläutert, vorgegangen.

Die Östrogenvorbehandlung in der niedrig dosierten Form erbrachte keine Synthesesteigerung von Progesteronrezeptoren im Nierenkarzinomgewebe. Der durchschnittliche Wert der R 5020-Bindungskapazität betrug 2 fmol/mg Cytosolprotein. Wiederholte Rezeptorbestimmungen von unterschiedlichen Tumorarealen desselben Tumors ergaben nur leicht differenzierte Bindungskapazitäten.

Die Tabelle 2 gibt die Bindungskapazitäten bei Östrogen-hochdosierten Patienten wieder. Das methodische Vorgehen entspricht der Rezeptorbestimmung bei Östrogen-niedrig dosierten Patienten.

Patienten, Alter, Geschlecht	Progynon^{R}-Depot (Östradiol-17-valerianat) intramuskulär Dosierung/Tag (mg)	Behandlungsdauer (Tage)	R_{5020}-Bindungskapazität (fmol/mg Cytosolprotein)	
			Mehrfachbestimmungen	Einzelbestimmungen Mittelwerte
1. O.,48 J. ♂	40	3		0
2. K.,67 J. ♀	40	4		1.1
3. L.,70 J. ♂	40	4		17
4. C.,54 J. ♂	40	5		1.4
5. B.,63 J. ♂	40	5		1.2
6. K.,57 J. ♀	40	5		1.1
7. H.,72 J. ♂	100	3		0
8. W.,58 J. ♂	100	3	4.4 2.0	3.2
9. H.,87 J. ♀	100	3	5.8 2.7	4.2
10. M.,47 J. ♂	100	4		0
11. K.,63 J. ♂	100	4		1.8
12. M.,53 J. ♂	100	5		0
13. T.,71 J. ♂	100	6		1.4
14. G.,77 J. ♂	100	6		10
15. P.,58 J. ♀	100	6		0
16. M.,40 J. ♀	100	6		0

Bei 6 von 16 Patienten konnten keine Progesteron-rezeptoren nachgewiesen werden. Von den verbleibenden 10 Patienten wiesen 6 Bindungskapazitäten bis zu 2 fmol/mg Cytosolprotein auf. Im Tumorcytosol von 4 Patienten war die R 5020-Bindungskapazität höher als 3 fmol/mg Cytosolprotein. Nur 2 Patienten (12,5 %) wiesen eine Bindungskapazität von 10 und 17 fmol/mg Cytosolprotein auf. Die durchschnittliche Bindung im Tumorcytosol derjenigen Patienten, welche nur mit 40 mg Progynon^{R}-Depot vorbehandelt wurden, betrug 3.6 fmol; bei einer Vorbehandlungsdosis von 100 mg/die fanden sich durchschnittlich nur 2.1 fmol/mg Cytosolprotein.

V.1c. Nachweis cytosolischer Inhibitoren der R 5020-Bindung

Um festzustellen, ob im Tumorcytosol hypernephroider Nierenkarzinome des Menschen Inhibitoren der Gestagenbindung existieren, wurde das Tumorcytosol und menschliches Uteruscytosol mit [^{3}H]R 5020 jeweils getrennt und in einem Verhältnis von 1: 1 (w/v) inkubiert. Mit Hilfe der Dextrankohle-Methode wurde die Reaktion gestoppt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Patienten, Alter, Geschlecht	Vorbehandlung der Tumorpatienten				R5020-Bindungskapazität [fmol/mg Cytosolprotein]				
	Progynon^{R}-Depot intramuskulär		Progynon^{R}-C		Uterus	Tumor	Uterus + Tumor (1:1)		
	Tage	Dosierung (mg)	Tage	Dosierung (0.02mg/Tabl.)			gemessene Kapazität	erwartete Kapazität	Hemmung der spezifischen Bindung (%)
1. M., 49J. ♀	6	100	-	-	178	0	16	89	82
2. P., 58J. ♀	6	100	-	-	129	4	42	67	37
3. Sch.,52J.♀	1	10	6	3 x 1	138	0	40	69	42
4. H., 40J. ♂	1	10	6	3 x 1	111	6	36	59	39
5. E., 60J. ♀	1	10	6	3 x 1	88	3	15	52	71
6. G., 60J. ♀	1	10	-	-	16	0	15	52	12
7. W., 55J. ♀	-	-	-	-	11	2	8	6	0
8. Si.,58J. ♀	-	-		-	35	1	13	18	28
9. H., 65J. ♂	-	-		-	33	0	0	17	100

Tabelle 3: R 5020-Bindungshemmung bei 9 Östrogen-vorbehandelten und -unvorbehandelten Patienten.

Die ^{3}H R 5020-Bindungskapazität im Tumorcytosol betrug im Durchschnitt 1.8 fmol und variierte zwischen 0 und 6 fmol/mg Cytosolprotein. Im Gegensatz dazu wies das Uterusmaterial mit 82 fmol eine wesentlich höhere Bindungskapazität auf.

Von Bedeutung ist, daß bei den gemischten Cytosolexperimenten (Uterus/Tumor) die gemessene $[^{3}H]$ R 5020-Bindung gegenüber der zu erwartenden Bindungskapazität erheblich reduziert war. Die Inhibition der spezifischen $[^{3}H]$ R 5020-Bindung durch unbekannte Komponenten im Tumorcytosol zeigte deutliche Schwankungen. Im Durchschnitt betrug die Bindungshemmung 46 % der zu erwartenden Bindungskapazität. Nur bei einem Patienten (Pat. H., 65 J., ♂, Tabelle 3) von insgesamt neun Untersuchten konnte eine völlige Hemmung der R 5020-Bindungsfähigkeit festgestellt werden.

V. 1d. Glucocorticoid-Rezeptorstudien

Ähnlich wie bei dem synthetischen Gestagen R 502(beinhaltet die Glucocorticoid-Rezeptorbestimmung durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethas(den Vorteil, allein den wirklichen Glucocorticoi(rezeptorspiegel zu bestimmen, ohne Interferenz mi dem corticosteroid-bindenden Globulin (CBG), da infolge von Serumkontamination des Cytosols vor- handen sein kann, an das aber Dexamethason nicht bindet.

Um die Affinität der Dexamethasonbindung an cyto- plasmatische Komponenten zu analysieren, wurde das Tumorcytosol mit steigenden Konzentrationen ^{3}H Dexamethason inkubiert. Paralleltitrationer in Abwesenheit von unmarkiertem Dexamethason er- brachten die unspezifische Bindung; von der totalen Bindung wurde dieser Betrag substrahiert, um so die rezeptorspezifische Glucocorticoid- bindung zu erhalten.

Die scheinbare Dissoziationskonstante des Dexamethason-Hormonrezeptorkomplexes wurde durch die SCATCHARD-Methode ermittelt. Die Abbildung 6 zeigt Daten der Titrationsanalyse von Patient M. (40 Jahre, ♀).

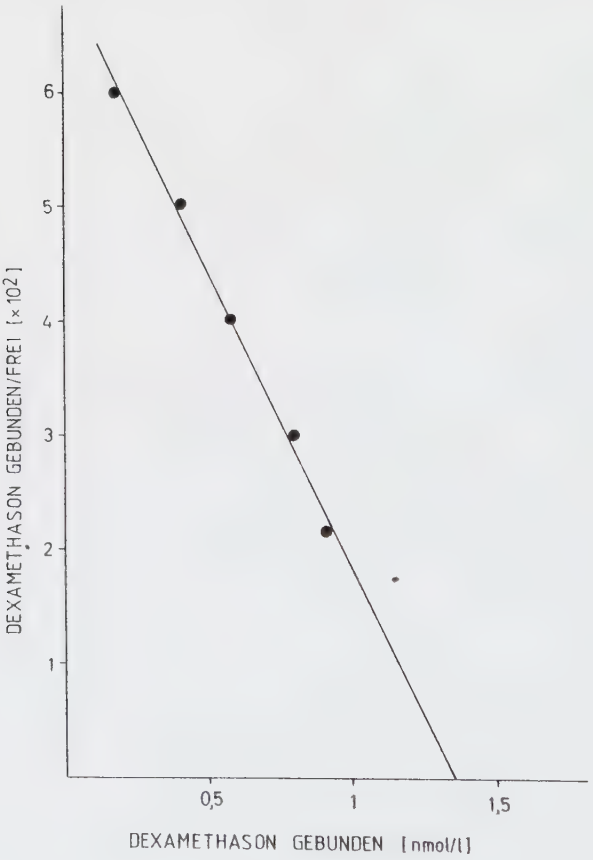

Abbildung 6: SCATCHARD-Analyse der Titrationsdaten der Glucocorticoid-Bindung bei Patient M. (40 Jahre, ♀).

Aus der Steigung dieser Geraden errechnet sich die Dissoziationskonstante für den Dexamethason-binderkomplex von 1.9 x 10^{-8} mol/l.

Um die Spezifität des Dexamethasonbinders festzustellen, wurden Kompetitionsversuche mit verschiedenen nicht markierten Steroidhormonen durchgeführt. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick der ^{3}H -Dexamethason-Bindungskapazität und -Ligandenspezifität im Tumorcytosol von 10 Patienten.

Patient, Alter, Geschlecht	[^{3}H] Dexamethason-Bindungskapazität [fmol/mg Cytosolprotein]	Hemmung [%] der spezifischen Bindung durch unmarkiertes					
		Dexamethason	Cortisol	Progesteron	Medroxyprogesteronacetat	Aldosteron	17ß-Östradiol
1. P., 58 J. ♀	3.5	100	62	6	73	0	0
2. D., 50 J. ♀	0.8	100	63	0	100	56	0
3. C., 54 J. ♀	4.4	100	70	63	95	76	81
4. M., 40 J. ♀	0.4 29.1	100 100	92 92	45 78	59 -	68 85	0 16.5
5. Mü.,60 J. ♂	0.8	100	80	100	-	80	0
6. Da.,40 J. ♀	0.75	100	66	55	-	0	0
7. Pr.,58 J. ♀	8.4	100	85	71	-	82	40
8. K., 55 J. ♂	17.2	100	81	74	-	73	29
9. Ha.,40 J. ♂	2.8	100	79	72	-	-	-
1o. W., 58 J. ♂	11	100	64	23	91	12	15
Mittelwert der Rezeptor-positiven Proben	7.1	100	75	53	84	53	18

Tabelle 4: ^{3}H Dexymethason-Bindungskapazität und -Liganden-spezifität im Tumorcytosol von 1O Patienten.

Der stärkste Kompetitor der Dexamethasonbindung ist Cortisol. Wie zu erwarten, wurde 17ß-Östradiol, ein Steroid ohne Glucocorticoidaktivität, nur schwach bzw. überhaupt nicht gebunden. Das Mineralocorticoid Aldosteron konkurrierte mit Dexamethason ebenfalls nicht stark um dessen Bindung.

Interessanterweise verhinderte Progesteron, von dem bekannt ist, daß es die Glucocorticoid-induzierte Proteinsynthese in der Leber hemmen kann (179), die Bildung von Dexamethason-Rezeptorenkomplexen.

Medroxyprogesteronacetat, das gestagene Agens, das klinisch bei der Hormontherapie des metastasierenden hypernephroiden Nierenkarzinoms teilweise mit Erfolg

eingesetzt wurde, konkurriert am stärksten um die Bindung an den Dexamethasonrezeptor.

Die Existenz glucocorticoidbindender Komponenten konnte bei 10 von 15 Tumorcytosolen festgestellt werden.

Die Bindungskapazität betrug durchschnittlich 7.1 fmol/mg Cytosolprotein und lag zwischen 0.4 und 29.1 fmol/mg Cytosolprotein.

V. 1e. Androgen-Rezeptorstudien

Konstante Cytosolvolumina (200 µl) wurden mit tritiiertem R 1881 titriert, um die Affinität und Kapazität der R 1881-Bindung zu ermitteln. Die Reaktion wurde jeweils mit Hilfe der Dextran-kohle-Methode gestoppt.

Die Abbildung 7 demonstriert eine typische Sättigungskurve (A), welche nach der Methode von SCATCHARD berechnet dargestellt ist (B). Steigende Menge [^{3}H]R 1881 (0,5 - 21 nmol) wurden entweder allein oder in Gegenwart nicht markierten R 1881 eingesetzt. Die spezifische Bindung ergab sich wiederum aus der Differenz von totaler und unspezifischer Bindung.

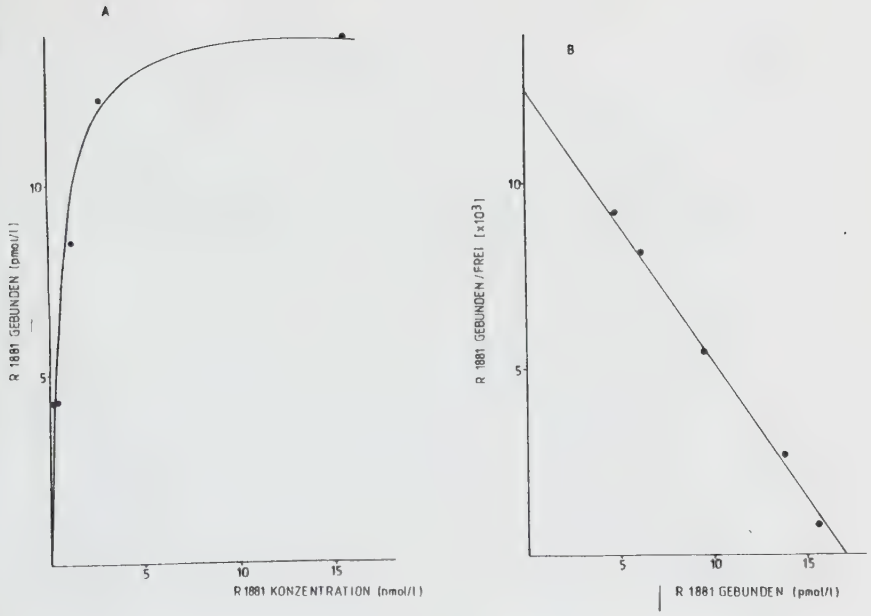

Abbildung 7: Typische Titrationskurven der R 1881-Bindung im Tumorcytosol eines Patienten.

Der monophasische SCATCHARD-Plot wird als Hinweis auf eine einzige Klasse androgener Bindungsstellen im Tumorcytosol angesehen.

Die Bindungsdaten von 3 Patienten, deren Tumorcytosol R 1881-rezeptorähnliche Komponenten aufwies, sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Patienten, Alter, Geschlecht	[^{3}H]R 1881 Bindungskapazität (fmol/mg Cytosolprotein)	Scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) [mol/l]
1. Pat. W., 57 J., ♀		
1. Bestimmung	7.2	1.8×10^{-9}
2. Bestimmung	9.7	2.2×10^{-9}
2. Pat. K., 64 J., ♂	3.5	1.1×10^{-9}
3. Pat. F., 68 J., ♂	2.0	1.4×10^{-9}

Tabelle 5: Maximale Bindungskapazität und scheinbare Dissoziationskonstante der [^{3}H]R 1881-Bindung durch das Tumorcytosol von Nierenkarzinomen. Die Werte wurden durch SCATCHARD-Analysen ermittelt. Methodische Details sind aus der Legende zur Abbildung 8 ersichtlich.

Die Anzahl dieser Komponenten variierte zwischen 2 - 9.7 fmol/mg Cytosolprotein. Wiederholte Analysen der R 1881-Bindung aus dem Cytosol unterschiedlicher Tumorareale ergaben ähnliche Bindungsdaten.

Um die Hormonspezifität - hohe Affinität und niedrige Kapazität - der R 1881-Bindung noch näher zu charakterisieren, wurden im Tumorcytosol Kompetitionsstudien mit verschiedenen nicht tritiierten Hormonen wie R 1881, 5 α-Dihydrotestosteron und 17ß-Östradiol durchgeführt. Die Abbildung 8 demonstriert diese Analysen:

Nicht tritiiertes R 1881 verursacht die größte Hemmung der [^{3}H] R 1881-Bindung. Auch unmarkiertes 5α-Dihydrotestosteron kann diese Bindung stark kompetieren. 17ß-Östradiol dagegen kann erst in hoher Konzentration [^{3}H] R 1881 von seinen Bindungsstellen teilweise verdrängen.

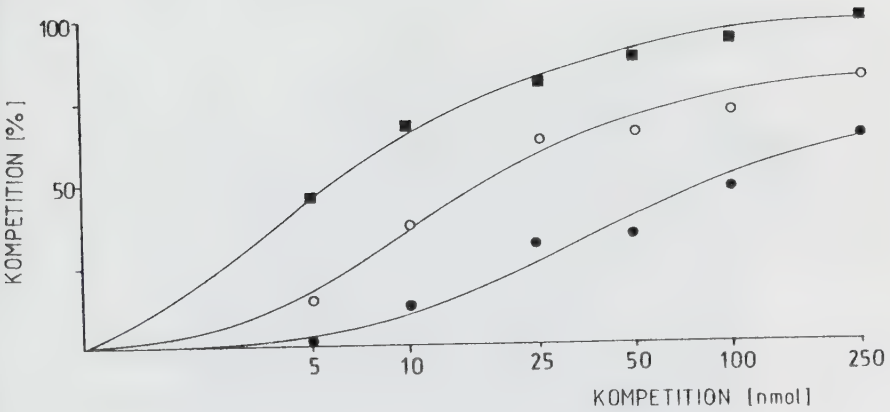

Abbildung 8: Die Hemmung der cytosolischen [^{3}H] R 1881-Bindung durch steigende Konzentrationen unmarkierter Kompetitoren (■ —— ■ R 1881, o —— o 5α Dihydrosteron, ● —— ● 17 ß-Östradiol. Die Hemmung der [^{3}H] R 1881-Bindung durch 250 nmol/l unmarkiertem R 1881 wurde mit 100 % angenommen. Die Konzentration der Kompetitoren ist im logarithmischen Maßstab angegeben.

V. 2. Untersuchungen an enzymatisch isolierten Tumorzellen

V. 2a. Zellmorphologie

Die in kleine Fragmente mit der Schere unter Kühlung zerkleinerten Tumorfragmente (ca. 1 mm Kantenlänge) wurden mit Kollagenase versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation der Suspension in einem Schüttelbad wurde die Aufschwemmung in einem Standzylinder mittels eines Pistills mechanisch weiter aufgeschlossen. Nach 20 sec sedimentierten die noch größeren Tumorstücke und wurden noch zweimal dem Isolierungszyklus mit Kollagenase unterzogen; die Überstände wurden jeweils gesammelt und für die Rezeptoranalyse verwandt.

Die Ausbeute an isolierten Zellen betrug 10 - 20 % des Tumorfeuchtgewichtes. Die Intaktheit der isolierten Tumorzellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Methode lichtmikroskopisch überprüft; ca. 90 % der isolierten Zellen waren aufgrund ihrer Nichtanfärbbarkeit durch Trypanblau vital.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten meist runde Zellen mit einem Durchmesser bis zu 100 - 200 µ. Charakteristisch waren polymorphe Einschlüsse und die z.T. kappenförmigen Zellanschwellungen.

Die folgenden Abbildungen (A - J) zeigen eine Auswahl transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen enzymatisch isolierter Tumorzellen.

Abbildung A: Zelltyp mit kurzen mikrovilliartigen Fortsätzen. Im Cytoplasma befinden sich viele mittelgroße und kleine Vakuolen sowie zahlreiche Lysosomen; die kleinen Vakuolen stellen erweitertes rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER) dar. Die wenigen Mitochondrien sind groß und rund und zeigen z.T. destruierte Cristae mitochondriales. Der Zellkern ist groß und rund, das Chromatin peripher stark kondensiert (12 000 x).

Abbildung B: Bei diesem Zelltyp ist die Oberfläche ebenfalls von Mikrovilli besetzt. Das ER ist zu kleineren Vakuolen geschwollen. Kleinere bis große hyaline Entmischungszonen des Cytoplasmas sind charakteristisch. Die Mitochondrien sind länglich mit gut ausgebildeten Cristae und dichter Matrix (12 000 x).

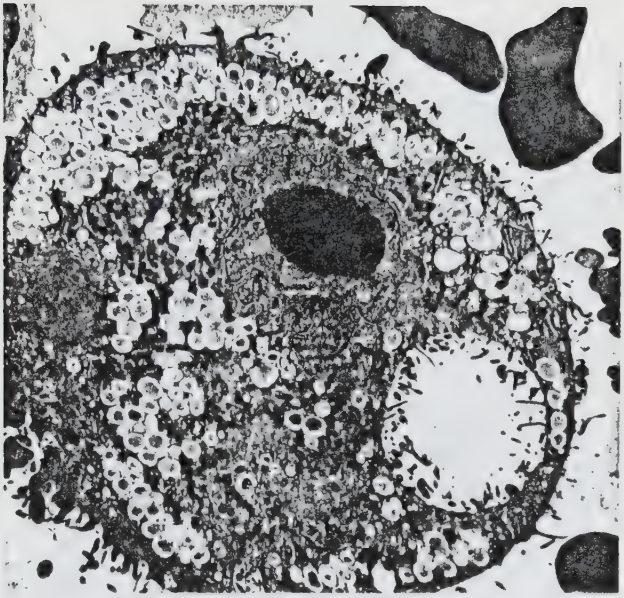

Abbildung C: Die Oberfläche dieser Zelle ist mit vielen länglich spitzen Mikrovilli umgeben. Ein- und Ausstülpungen der Zelloberfläche sind ein weiteres Merkmal dieses Zelltyps. Auffällig sind die stark ausgebildeten Fetteinlagerungen, die in manchen Zellen das gesamte Innere ausfüllen können. Mitochondrien sind in Vielzahl vorhanden, ER reichlich ausgebildet. Der Zellkern ist immer gelappt mit wenig randständigem Heterochromatin und sehr großem massiven Nucleus (12 000 x).

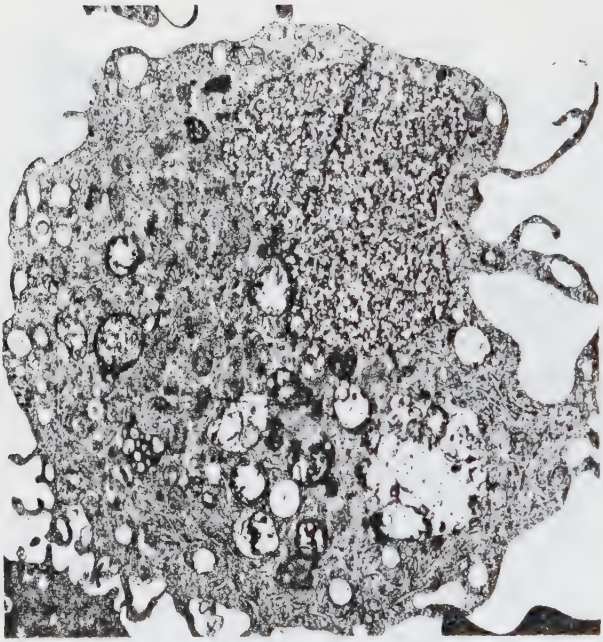

Abbildung D: Das Äußere dieses Zelltyps ist durch seine langen Fortsätze charakterisiert, welche im Zusammenhang mit der vermehrten Vakuolenbildung zu sehen sind. Die Vakuolen sind mit membranösen und elektronendichten Vesikeln ausgefüllt (Lysosomen?). Das reichlich vorhandene rauhe ER liegt insbesondere an der Peripherie der Zelle. Die Mitochondrien sind zahlreich und groß und durch Cristae reich strukturiert. Der Zellkern ist oval bis leicht eingebuchtet, das Chromatin homogen verteilt und niemals kondensiert (11 000 x).

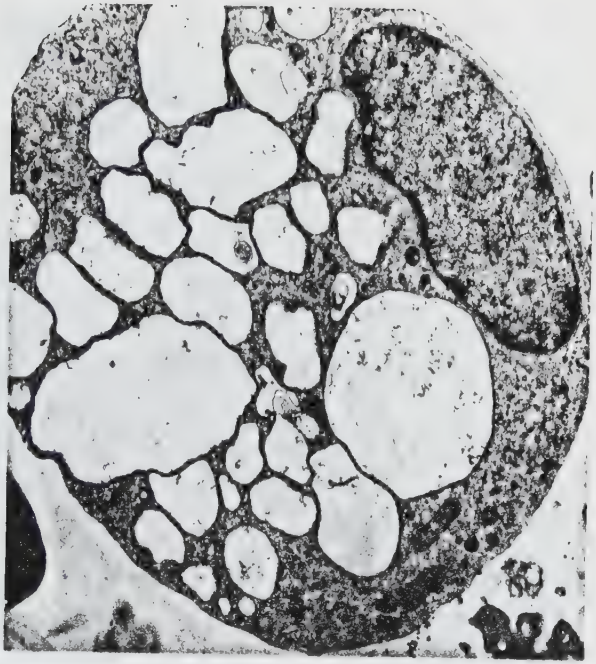

Abbildung E: Diese Zelle hat eine glatte Oberfläche und zeigt mehrere große Vakuolen. Wenige randständige Mitochondrien und kleinere ER-Vesikel sind zu beobachten. Der Zellkern ist oval und beinhaltet kondensiertes Chromatin (11 000 x).

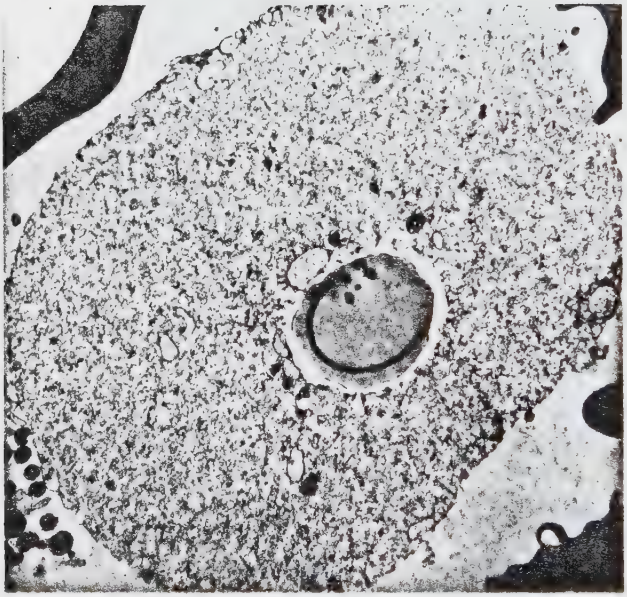

Abbildung F: Die Oberfläche dieser Zelle ist glatt, das Cytoplasma aufgehellt, homogen und unstrukturiert mit äußerst wenigen Zellorganellen. Vereinzelt ist geschwollenes ER zu sehen. Große vereinzelte Fetttropfen sind ihr auffälligstes Merkmal (12 000 x).

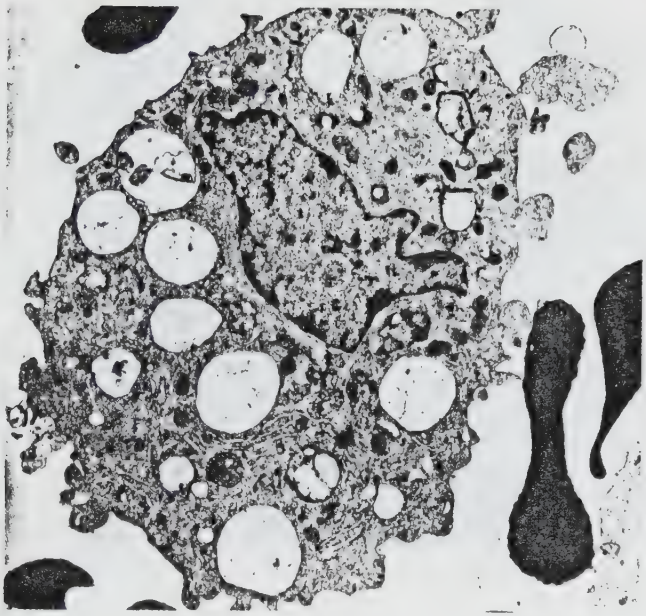

Abbildung G: Stumpfe kurze Fortsätze sind bei diesem Zelltyp als Oberflächendifferenzierung darstellbar. Das Cytoplasma beinhaltet ein als längere Zysternen sichtbares rauhes ER, viele große Vakuolen ohne strukturierten Inhalt, elektronendichte Lysosomen, aber wenige Mitochondrien. Der Zellkern ist gelappt, mit randständig kondensiertem Chromatin (12 000 x).

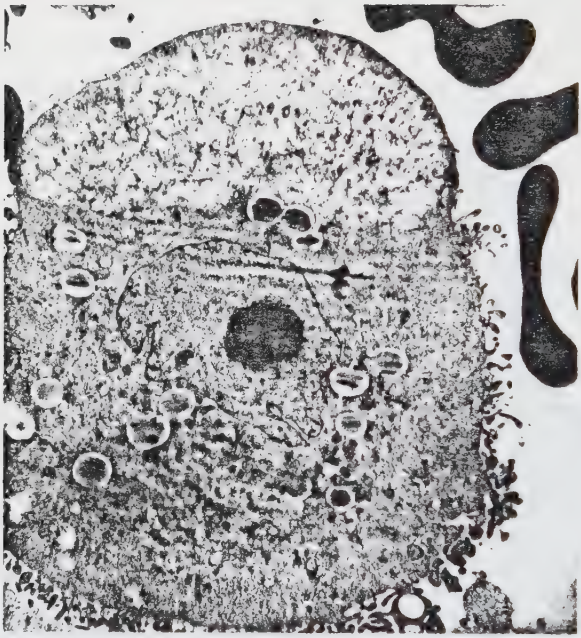

Abbildung H: Die Oberfläche dieser Zelle weist einen dichten Mikrovillibesatz auf. Das Cytoplasma läßt durch hyaline Entmischung die Zelle an einer Stelle kappenförmig anschwellen. In diesem Bereich ist die Zelloberfläche glatt. Neben einigen größeren Fetttropfen liegen im Cytoplasma viele kleine Mitochondrien. ER ist kaum vorhanden. Der Zellkern ist gelappt und hat neben einem homogenen Karyoplasma einen großen Nucleus (11 000 x).

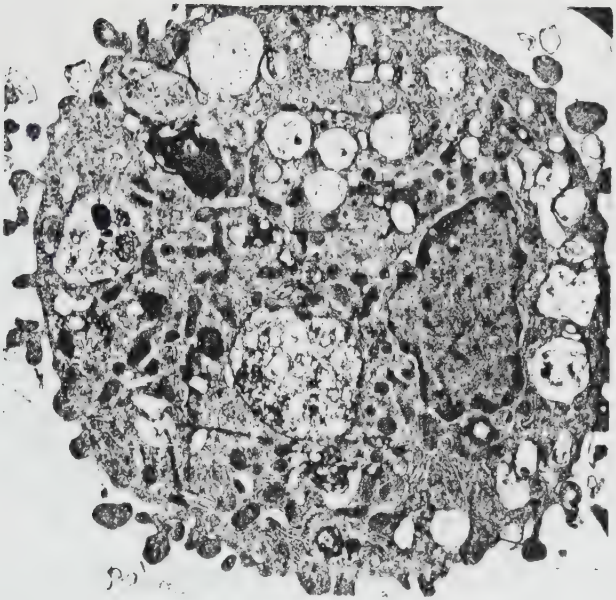

Abbildung I: Wenige kurze abgerundete Fortsätze kennzeichnen die Oberfläche dieses reich differenzierten Zelltyps. Das Cytoplasma besitzt ein gut ausgebildetes zisternenartiges rauhes ER, viele kleine und große Vakuolen. Diese beherbergen die unterschiedlichsten Einschlüsse: Membranvesikel, elektronendichte Strukturen, Myelinfiguren und andere Gebilde mit homogenem Inhalt. Große längliche Mitochondrien sind in Vielzahl vorhanden. Die wenigen Cristae sind von einer dichten Matrix umgeben. Der Zellkern ist oval, oft eingebuchtet mit randständigem elektronendichtem Chromatin (11 000 x).

V. 2b. Hormonrezeptoranalysen

V. 2b.1 R 5020-Bindungsstudien

In dem Bestreben, eine "Rezeptorvergiftung" durch unbekannte Faktoren, welche bei der Gewebehomogenisation aus subzellulären Kompartimenten frei werden könnten - in vivo aber getrennt vom Progesteronrezeptor in der Zelle lokalisiert sind - zu verhindern, wurden an enzymatisch isolierten vitalen Tumorzellen in sieben Fällen [^{3}H] R 5020-Bindungsstudien durchgeführt.

Sowohl die Affinität als auch die maximale Bindungskapazität der R 5020-Bindung in diesen Tumorzellen wurde bestimmt, indem ein konstantes Zellvolumen (0.5 ml) mit steigenden Konzentrationen (3 - 135 nmol/l) [^{3}H] R 5020 (30 min lang, bei 37^{o} C) inkubiert wurde. Paralleltitrationen in Anwesenheit von unmarkiertem R 5020 (1 µmol/l) erlaubten die Korrektur der Bindungsdaten um den Betrag an unspezifischer Bindung.

In 5 von 7 analysierten Tumoren konnte keine spezifische Bindung festgestellt werden. Die Karzinomzellsuspension eines Patienten zeigte jedoch eine deutliche R 5020-Bindung. Die Abbildung 9 demonstriert die entsprechende SCATCHARD-Analyse dieses Patienten.

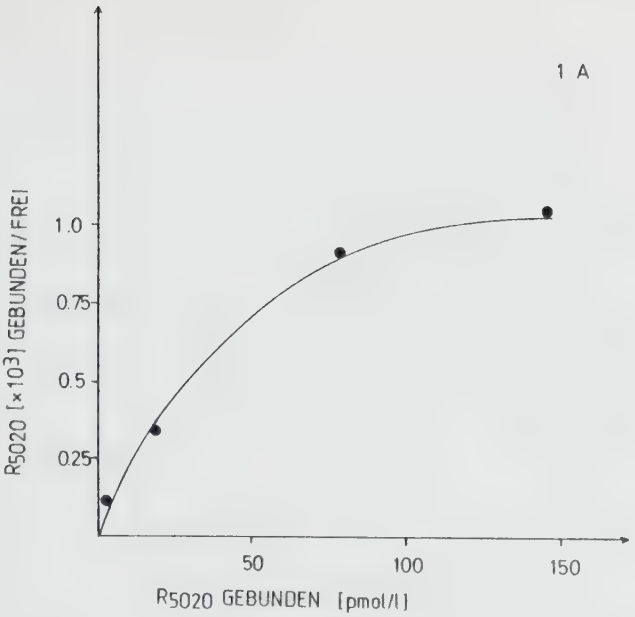

Abbildung 9: R 5020-SCATCHARD-Analyse einer Karzinomzellsuspension (Patient 1 A, 58 Jahre, ♀).

Bei einem anderen Patienten (Patient 1 B, 49 Jahre, ♀) fand sich eine zu sättigende R 5020-Bindung seiner isolierten Tumorzellen, die für einen Hormonrezeptor typisch ist. Hier wurden steigende Mengen [^{3}H] R 5020 (1,5 - 32 nmol/l) eingesetzt. Die Abbildung 10 zeigt die Bindungsdaten dieses Patienten.

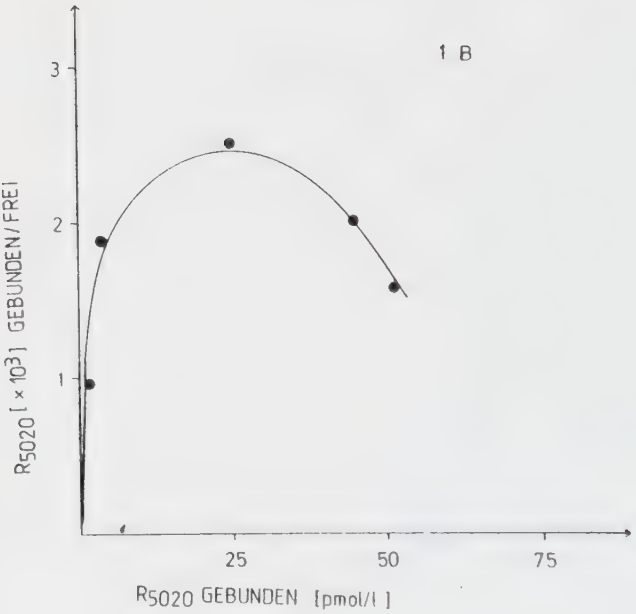

Abbildung 10: R 5020-Bindungsdaten einer Karzinomzellsuspension (Patient 1 B, 49 Jahre, ♀).

Die scheinbare Dissoziationskonstante bei diesem Untersuchten (Abb. 10) betrug 2 x 10^{-8} mol/l. Die Anzahl der Rezeptorbindungsstellen, ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen Rezeptor und R 5020 von 1 : 1 vorausgesetzt, betrug 2610 pro Zelle.

V. 2b.2. Glucocorticoid-Bindungsstudien

Um die bereits erläuterten möglichen Nachteile einer Rezeptorbestimmung im Tumorcytosol zu umgehen, wurden die Glucocorticoid-Bindungsstudien auch an enzymatisch isolierten Tumorzellen durchgeführt. Diese wurden mit steigenden Konzentrationen (6 - 65 nmol/l) $[^3H]$ Dexamethason (bei 37° C, 30 min) inkubiert. Ein zweiter Ansatz mit einem Überschuß an kaltem Dexamethason (1 µmol/l) erlaubte die Berechnung der spezifischen Bindung.

Die Abbildung 11 zeigt eine repräsentative SCATCHARD-Analyse der mit totalen Tumorzellen gewonnenen Bindungsdaten; es resultierte eine Gerade, aus deren Steigung die scheinbare Dossoziationskonstante des Dexamethason-Rezeptorkomplexes mit 1.5×10^{-8} mol/l bestimmt wurde. Die Anzahl der Bindungsstelle betrug 1380 pro Zelle.

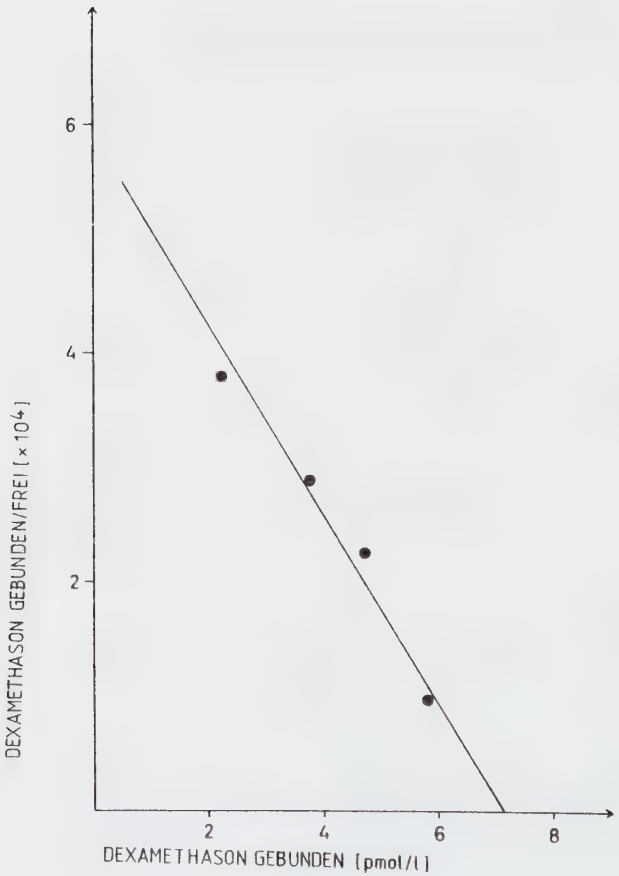

Abbildung 11: Dexamethason SCATCHARD-Analyse einer Karzinomzellsuspension (Patient W., 58 J., ♂).

V. 2b. 3. Proteinsyntheseraten enzymatisch isolierter vitaler Nierenkarzinomzellen unter dem Einfluß von Steroidhormonen

Die Ausbeute an isolierten Zellen betrug 10 - 20 % des Tumorfeuchtgewichtes. Die Integrität der Tumorzellen wurde routinemäßig lichtmikroskopisch unter Verwendung der Trypanblau-Methode überprüft. Auf der Basis einer Nichtanfärbbarkeit durch Trypanblau waren ca. 90 % der isolierten Zellen vital. Von 25 untersuchten Nierenkarzinomen waren bei 10 Tumoren eine für Stoffwechseluntersuchungen ausreichende Tumorzell-Ausbeute zu erzielen

Die isolierten Tumorzellen behielten die Fähigkeit zur Proteinsynthese. Nach dreistündiger Vorinkubation in Anwesenheit von Hormonen inkorporierten die Zellen während der anschließenden zweistündigen Hauptinkubation in Gegenwart des radioaktiven Tracers 3.7 nmol (U-^{14}C) L-Leucin pro Gramm Feuchtgewicht in die säurefällbare Zellfraktion. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, differieren die Aminosäure-Einbauraten deutlich von Tumor zu Tumor.

Patient, Alter, Geschlecht,	Kontrollen [nmol (U-^{14}C) L-Leucin inkorporiert/ g Tumor Feuchtgewicht	Hormoneffekt (%) 17 ß-Östradiol [10 nmol/l]	Progesteron [10 nmol/l]
1. Pat. P., 58 J., ♂	10.87	- 19.6	- 14.8
2. Pat. H., 65 J., ♂	6.64	- 4.4	./.
3. Pat. S., 64 J., ♀	5.60	+ 7.2	- 7.4
4. Pat. B., 61 J., ♀	5.38	- 4.7	- 10
5. Pat. W., 58 J., ♂	3.83	- 7.4	- 10
6. Pat. H., 55 J., ♂	1.22	+ 7.8	./.
7. Pat. K., 48 J., ♂	1.13	+ 6.3	./.
8. Pat. O., 53 J., ♀	1.05	+ 3.5	- 9.36
9. Pat. K., 76 J., ♂	1.05	- 2.1	- 4.6
10. Pat. E., 48 J., ♂	0.69	+ 6.4	./.

Tabelle 6: Effekte von 17 ß-Östradiol und Progesteron auf die Proteinsyntheseraten isolierter Tumorzellen aus hypernephroiden Nierenkarzinomen. Die Tumorzellen wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Steroidhormone 5 Std. bei 37° C inkubiert. Während der letzten 2 Std. der Inkubationsperiode wurde der Einbau von [U-^{14}C] L-Leucin (0.25 µCi/40 mg Tumorzellen) in die säurefällbare Tumorzellfraktion ermittelt (./. = nicht untersucht).

Die Wirkung von 10 nmol/l 17ß-Östradiol auf die Proteinsyntheseraten ist gering und uneinheitlich. In 5 von 10 Tumoren war eine leichte Stimulation der [U-^{14}C] L-Leucin-Konkorporation zu beobachten, während die übrigen Karzinome auf 17ß-Östradiol mit einer schwachen Hemmung der Proteinsynthese reagierten.

Die Effekte von 10 nmol/l Progesteron sind zwar gleichfalls gering, aber einheitlich. In den Zellsuspensionen aller 5 untersuchten Tumoren bewirkte Progesteron eine Hemmung des Aminosäure-Einbaus von 9.4 $\pm$ 1.7 % ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Kontrollen.

VI. Diskussion

Das Mammakarzinom ist das beste Beispiel eines hormonsensiblen Tumors, dessen Wachstum bzw. das seiner Metastasen durch bestimmte Hormone gehemmt werden kann (84, 124). Eine objektive Rückbildung des Tumors bzw. seiner Metastasen wird jedoch beim Mammakarzinom bei nur 20 - 40 % aller Patienten erreicht.

Es kann heute als gesichert gelten, daß beim Mammakarzinom der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren zuverlässig eine Aussage seiner therapeutischen hormonellen Beeinflußbarkeit gestattet (124).

Die klinische Bedeutung der Steroidhormonrezeptor-Bestimmung beruht darauf, daß Rezeptoren im Zielorgan die initiale Bindungsreaktion zwischen Hormon und Zelle vermitteln; die primäre Bindung an Rezeptoren ist Bedingung für jede nachfolgende Hormonwirkung; diese kann u.U. in einer Beeinflussung des Tumorwachstums bestehen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren im Nierenkarzinom des Menschen, um mit der gezielten Hormon-

therapie neben der Tumornephrektomie und Bestrahlung eine weitere therapeutische Alternative bei der Bekämpfung dieser oft infausten Erkrankung zur Verfügung zu haben.

VI. 1. Rezeptoranalysen im Tumorcytosol

VI. 1a. Gestagen-Rezeptoranalysen bei Östrogen-unvorbehandelten und -behandelten Patienten

Die Ergebnisse der R 5020-Hormonrezeptorstudien beruhen auf Untersuchungen von 88 Nierenkarzinomen.

Die im Tumorcytosol gefundenen R 5020-bindenden Komponenten haben wie Progesteronrezeptoren in bekannten Zielorganen eine vergleichsweise hohe Affinität für Gestagene.

Zusätzlich entspricht das Sedimentationsprofil des R 5020-Binders (Maximum im 4 S-Bereich) demjenigen der monomeren Form des Progesteronrezeptors (190). Wie jedoch Kompetitionsversuche belegen, ist die R 5020-Bindung in der 4 S-Region nur teilweise spezifisch. Der hohe Anteil unspezifischer R 5020-Bindung kann die genaue Messung einer superponierten schwachen Bindung beeinträchtigen.

Im Gegensatz zu Befunden von CONCOLINO et al. (47, 48) konnte in den vorliegenden Untersuchungen kein hoher Gestagenrezeptorgehalt in hypernephroiden Karzinomen nachwiesen werden. Dieser Autor fand in zehn untersuchten Nierenkarzinomen eine durchschnittliche Rezeptorkonzentration von über 100 fmol/ml Cytosolprotein; die niedrigste Konzentration lag bei 8, die höchste bei 196 fmol. Trotz der großen Anzahl untersuchter Patienten überstieg die R 5020-Bindungskapazität in der vorliegenden Studie nicht die 7 fmol-Grenze.

Diese deutliche Diskrepanz könnte daraus resultieren, daß für die Rezeptorstudien verschiedene radioaktiv markierte Substanzen eingesetzt wurden. Während CONCOLINO radioaktiv markiertes Progesteron verwendete, wurde in dieser Arbeit R 5020, ein synthetischen Progesteron, das nicht an Transcortin bindet, eingesetzt. Transcortin kann im Tumorcytosol durch Serumkontamination auftreten; Progesteron bindet außer an Gestagenrezeptoren aber auch an das Transcortin; so können hohe Rezeptorkonzentrationen vorgetäuscht werden. Die Bindungsstudie mit R 5020 umgeht diese Fehlerquelle, da die Substanz ausschließlich an den Gestagenrezeptor bindet.

Die zusätzliche Progesteronbindung an das Transcortin kann allerdings durch Zugabe von Cortisol zu dem

Reaktionsansatz teilweise verhindert werden; dabei blockiert das Cortisol Bindungsstellen am Transcortin, die auch Progesteron binden. CONCOLINO et al. (47, 48) scheint es trotz dieser Cortisolzugabe nicht gelungen zu sein, die Progesteronbindung an Transcortin völlig zu blockieren; nur so lassen sich die von dieser Arbeitsgruppe gefundenen hohen Rezeptorgehalte erklären.

Gegen die Ergebnisse von CONCOLINO sprechen auch neuere klinische Beobachtungen (HRUSHESKY, 92), welche bei nur 2 von 416 Patienten eine Hormontherapiewirkung verzeichnen.

Die vorliegenden R 5020-Analysen, an einer großen Anzahl von Patienten durchgeführt, werden durch analoge Rezeptoruntersuchungen von TOBIN et al. (197) ergänzt. TOBIN verwandte ebenfalls [^{3}H] R 5020 und untersuchte das Tumorcytosol mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und der Dextrankohle-Methode:

Von 13 mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation untersuchten Tumorcytosolen konnte in 3 Fällen die rezeptortypische 4 S-Sedimentationskonstante gefunden werden.

Bei 11 Patienten wies das durch die Dextrankohle-Methode analysierte Tumorcytosol in zwei Fällen eine Bindungskapazität von 8 und 12 fmol/mg Cytosolprotein sowie eine scheinbare Dissoziationskonstante von 8×10^{-9} und 5×10^{-9} mol/l auf.

Die Ergebnisse von ROTH-MEYER (177), der anstelle des $[^3H]$R 5020 tritiiertes Medroxyprogesteronacetat (MPA) verwandte, bestätigen ebenfalls den niedrigen Gehalt von Gestagen-bindenden Komponenten im Nierenkarzinom. Seine Untersuchungen bei 6 Patienten ergaben $[^3H]$ MPA-Bindungskapazitäten von 10 fmol/mg Cytosolprotein.

In der vorliegenden Studie konnte in nur 5.6 % aller untersuchten Tumoren eine R 5020-Bindungskapazität von mehr als 3 fmol/mg Cytosolprotein gefunden werden. Als Ursache dieser niedrigen Hormonrezeptorkonzentration könnte ein Verlust der Rezeptorpopulation in maligne entartetem Gewebe angesehen werden. Bei Rezeptorverlust kann keine Ansprechbarkeit auf eine Hormontherapie erfolgen.

Bei den meisten Patienten wurden Rezeptorspiegel gefunden, die mit 2 fmol/mg Cytosolprotein an der Grenze biologischer Funktionalität liegen.

Von den Östrogenen ist bekannt, daß sie potente Induktoren der Progesteronsynthese sind (84, 88, 93, 124, 161, 164, 190). Aus diesem Grund wurden insgesamt 24 Patienten kurze Zeit vor der geplanten Tumornephrektomie mit

Östrogenen vorbehandelt. Diese Vorbehandlung erfolgte in der Hoffnung, den Progesteronrezeptorgehalt erhöhen zu können, um die Rezeptornatur der Bindungskomponenten genauer überprüfen zu können. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis Östrogen-bindender Komponenten im hypernephroiden Nierenkarzinom des Menschen von Bedeutung (BOJAR 27, CONCOLINO, 47). Diese Untersuchungen sind die theoretische Grundlage des Versuches, mit Hilfe einer Östrogenvorbehandlung den Progesteronrezeptor-Spiegel anzuheben.

Wie aber aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, konnten im Tumorcytosol präoperativ Östrogen-niedrig dosierter Patienten im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tumorpatienten keine höheren Progesteronrezeptor-Spiegel gefunden werden; sowohl bei der unvorbehandelten als auch bei der Östrogenbehandelten Gruppe wurde eine mittlere R 5020-Bindungskapazität von 2 fmol/mg Cytosolprotein ermittelt.

Zieht man in Betracht, daß JÄNNE et al. (93) im Uterusgewebe von Frauen in der Postmenopause durch eine ähnlich niedrige Östrogenvorbehandlung, wie sie bei dieser Studie gewählt wurde, eine deutliche Progesteronrezeptor-Zunahme hervorrufen konnte, so kann die Ursache der Unempfindlichkeit des Nierenkarzinomgewebes gegenüber

dieser Vorbehandlung auf den ersten Blick nicht in der gewählten niedrigen Dosierung liegen.

Dennoch wurde aus folgendem Grund versucht, mit einer hochdosierten Progynon^{R}-Vorbehandlung höhere Rezeptorspiegel zu erzielen:

Die Konzentration Östrogen-bindender, Rezeptor-charakteristischer Komponenten im Nierenkarzinom des Menschen beträgt 17.5 $\pm$ 3.8 fmol/mg Cytosolprotein (27). Die Hormonwirkung ist eine Funktion (allerdings keine lineare Funktion) der Anzahl gebildeter Hormonrezeptor-Komplexe. Diese sind sowohl abhängig von der Konzentration des Rezeptors als auch des Hormons; so verlangt eine niedrige Rezeptorkonzentration im Gewebe eine hohe Hormondosis zur Bildung wirksamer Mengen an Hormon-rezeptor-Komplexen.

Die entsprechende Vorbehandlung (Tabelle 2) führte allerdings nicht zu einer deutlichen Erhöhung der R 5020-Bindungskapazität. Nur bei 2 Patienten (Pat. Z. und G., Tabelle 2) konnten Bindungskapazitäten, die die Werte von unvorbehandelten Patienten deutlich überstiegen, festgestellt werden. Ob diese Cytosol-Rezeptorspiegel jedoch eine individuelle Hormonsensibilität für Progesteronderivate signalisieren, muß noch weiter abgeklärt werden.

VI. 1b. Inhibitoren der Gestagenbindung

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit berichten andere Autoren über hohe Progesteronrezeptor-Spiegel im Nierenkarzinom bei Östrogen-unvorbehandelten Patienten (47, 48, 125). Diese Diskrepanz und eine kürzlich von SLOWMAN (188) publizierte Arbeit über die Hemmung der Glucocorticoid-Rezeptorbindung durch Inaktivatoren dieser Rezeptoren im Tumorcytosol von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie, die bei der Tumorcytosolherstellung u.U. freigesetzt werden, führte zur Entdeckung von Inhibitoren der R 5020-Bindung an Progesteronrezeptoren im Tumorgewebe des menschlichen Nierenkarzinoms. Diese Befunde erklären teilweise den festgestellten niedrigen Progesteronrezeptor-Gehalt und scheinen zunächst eine Interpretation der z.T. widersprüchlichen Daten, die in der Literatur über die endokrine Grundlage dieses Malignoms zu finden sind (40, 41, 125, 177, 197) zu ermöglichen.

Die Hypothese einer Inhibitorwirkung zur Erklärung niedriger Progesteronrezeptor-Konzentrationen kann allerdings aus folgenden Gründen nur mit Vorbehalt aufrecht erhalten werden:

Erstens entsprechen die Methoden der Cytosolpräparation derjenigen Autoren, welche hohe Rezeptorspiegel fanden auch denjenigen, welche in dieser Untersuchung angewandt wurden.

Zweitens reichte die inhibitorische Potenz fast aller Tumorcytosole nicht aus, um die R 5020-Uteruscytosolbindung vollständig zu unterdrücken (Tabelle 3); vielmehr ist diese nach Zugabe des Tumorcytosols nur reduziert. Lediglich in einem Fall (Pat. H., 65 J., ♂, Tabelle 3) konnte auf diese Weise die Rezeptor-Bindungsfähigkeit des Uterus vollständig aufgehoben werden.

Drittens zeigen die noch zu erläuternden Rezeptorbindungsstudien an intakten enzymatisch isolierten Zellen im allgemeinen deutlich, daß auch mit dieser Methode kein höherer Rezeptorgehalt im Vergleich zu analogen Analysen mit dem Tumorcytosol nachgewiesen werden kann.

Das Ergebnis der Inhibitoranalysen dieser Studie lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die meisten menschlichen Nierenkarzinome weisen Hemmfaktoren der Gestagenbindung auf.

2. Die inhibitorische Potenz dieser Substanzen reicht jedoch in nahezu allen Fällen nicht aus, die R 5020-Bindungskapazität vollständig zu blockieren.

VI. 1c. Glucocorticoid-Rezeptoranalysen

Ausgangspunkt der Glucocorticoid-Rezeptoranalysen sind folgende Beobachtungen:

Einerseits wirken Glucocorticoide auf Zellkulturen des hypernephroiden Nierenkarzinoms wachstumsfördernd (42, 195), andererseits ist von Hepatomzellkulturen bekannt, daß Progesteronderivate an den Glucocorticoidrezeptor binden können (199).

Die Bindung von Gestagenen an den Glucocorticoidrezeptor unterdrückt in Hepatomzellen die durch Glucocorticoide bewirkte Induktion verschiedener Enzymproteine (Antiinducerkonzept der Gestagenwirkung, 7, 179). Auf der Grundlage dieser experimentellen Befunde wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Die klinisch in der Therapie des hypernephroiden Nierenkarzinoms verwendeten Gestagene hemmen ein

durch Glucocorticoidwirkung unterhaltenes Tumorwachstum durch Bindung und anschließende Inaktivierung des Glucocorticoïdrezeptors im Karzinomgewebe.

Es konnte gezeigt werden, daß Glucocorticoidrezeptoren im Nierenkarzinom des Menschen existieren und diese eine deutliche Steroidhormon-Selektivität aufweisen. Insbesondere Medroxyprogesteronacetat (Clinovir^{R}), diejenige Substanz, welche bei der Hormontherapie schon klinisch mit teilweisem Erfolg erprobt ist, zeigt interessanterweise eine Bindung an den Glucocorticoidrezeptor; diese ist fast ebenso stark wie die Dexamethasonbindung selbst.

Unter diesen Voraussetzungen und aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann vermutet werden, daß z.B. Clinovir (Medroxyprogesteronacetat) deshalb eine Wachstumshemmung auf den Primärtumor und/oder die Metastasen ausübt, weil es über die Blockierung des Glucocorticoidrezeptors die biologische Wirkung dieses Steroidhormons verhindert.

So interessant diese Überlegungen auch sein mögen, so muß doch betont werden, daß zur Bestätigung dieser Hypothese noch weitere Versuche erforderlich sind. Diese müssen sowohl den wachstumsstimulierenden Effekt der

Glucocorticoide auf Tumorzellkulturen bestätigen als auch in derselben Versuchsanordnung die antiglucocorticoide Wirkung des Medroxyprogesteronacetats beweisen.

Eine Schwierigkeit dabei ist die Tatsache, daß das Nierenkarzinom, wie gezeigt werden konnte, nur niedrige Glucocorticoid-Rezeptorspiegel aufweist. Der niedrige Anteil eindeutig Rezeptor-positiver Patienten korreliert jedoch gut mit der geringen Zahl von Patienten, von denen in letzter Zeit eine erfolgreiche Hormontherapie bekannt ist (92).

Wiederholte Rezeptorbestimmungen von verschiedenen Arealen desselben Tumors (Pat. M., Tabelle 4) zeigen erstaunlicherweise deutlich abweichende Rezeptorspiegel. Dies könnte auf eine unterschiedliche Vitalität der Tumorzelle zurückzuführen sein. Allerdings wurden makroskopisch hämorrhagische und/oder nekrotische Bezirke nicht für Rezeptorbestimmungen benutzt.

Eine weitere Möglichkeit, die die unterschiedlich hohen Rezeptorspiegel in ein und demselben Tumor erklären würde, bestünde darin, daß die nachgewiesenen Rezeptoren aus normalem, im Tumorgewebe versprengtem Nierenparenchym, stammen.

Wahrscheinlicher für die Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse sind jedoch folgende Überlegungen:

1. Das Nierenkarzinom des Menschen könnte mosaikartig aus heterogenen Zellpopulationen aufgebaut sein.

2. Die Rezeptormoleküle wären dabei einer Population der Tumorzellen zuzuordnen.

VI.1d. Androgen-Rezeptoranalysen

Im Nierenkarzinom des Menschen konnten cytosolische R 1881-bindende Komponenten nachgewiesen werden, die wesentliche Merkmale androgener Rezeptoren in bekannten Zielorganen wie der Prostata (2) und dem Levator ani/M Bulbocavernosus-Komplex [LA/BC] (200) aufweisen.

Die scheinbare Dissoziationskonstante des R 1881-Binderkomplexes des Nierenkarzinoms (1.1 - 2.3 x 10^{-9} mol/l) zeigt mit den Werten, die vom Cytosol der Rattenprostata (0.6 x 10^{-9} mol/l) und dem LA/BC - Komplex (0.94 x 10^{-9} mol/l) (31, 200) bekannt sind, eine Übereinstimmung. Die Konzentration der Bindungsstellen im Nierenkarzinom ist mit 2.0 - 9.7

fmol/mg Cytosolprotein gering. In Cytosolpräparationen des M. vastus der Ratte und des LA/BC-Komplexes finden sich jedoch Rezeptorkonzentrationen in ähnlicher Höhe (M. vastus : 1.3 fmol/mg Protein, LA/BC : 11.7/mol/mg Protein, 200). Eine vergleichsweise niedrige Anzahl von Rezeptorbindungsstellen wurden ebenfalls im Cytosol des menschlichen Prostataadenoms gefunden (8.5 $\pm$ 0.95 fmol/mg Protein, 156).

In diesem Zusammenhang muß betont werden, daß unter den üblichen Versuchsbedingungen bei niedriger Temperatur mit der hier angewandten Methode fast ausschließlich nur nicht besetzte Bindungsstellen erfaßt werden.

Bedingt durch die niedrige Dissoziationsrate des Androgen-Rezeptorbindungskomplexes bei 0°, tauschen Rezeptoren, welche in vivo bereits mit endogenem Androgen besetzt sind, nicht dieses gebundene Hormon gegen [^{3}H] R 1881 aus. Demnach entgehen bereits besetzte Bindungsstellen der Analyse. Im menschlichen Prostataadenom z.B. beträgt der Anteil des freien Rezeptors nur 1/10 der gesamten Rezeptorkonzentration (71). Unsere Ergebnisse (s. Tabelle 5) deuten in eine ähnliche Richtung.

So können die im Vergleich zu den Männern etwa 3 mal höheren Konzentrationen der nichtbesetzten Bindungsstelen bei der Frau (Patientin W, 57 Jahre, Tabelle 5) dahin-

gehend interpretiert werden, daß, bedingt durch den niedrigen Gehalt zirkulierender Androgene bei dem weiblichen Individuum, das Verhältnis von nicht gebundenem zu gebundenem Rezeptor größer ist als beim Mann.

Die Ergebnisse der Kompetitionsstudien (s. Abb. 8) stimmen bis auf geringfügige Abweichungen mit den Resultaten von Androgenrezeptor-Spezifitätsuntersuchungen in der Prostata und der Muskulatur überein (32. 146).

5 α -Dehydrotestosteron (DHT) hat eine deutlich geringere Affinität für cytosolische Androgenbinder als R 1881. Im Tumorcytosol beträgt die relative Bindungsaffinität 0.34; ähnliche Werte finden sich für DHT-bindende Komponenten im Prostatacytosol der Ratte (0.3) (32). Der Ratten LA/BC-Androgenrezeptor bindet DHT nur halb so stark wie unmarkiertes R 1881 (200).

Im Gegensatz zu diesen androgenen Zielorganen zeigen Androgen-bindende Komponenten im M. Vastus der Ratte für DHT eine höhere Affinität als R 1881 (200).

Die unterschiedlichen Befunde beim Nierenkarzinom, der Rattenprostata und dem LA/BC-Komplex einerseits sowie dem M. vastus der Ratte andererseits können durch den

inhibitorischen Einfluß von 3 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf die Bildung des DHT-Rezeptorkomplexes in M. vastus erklärt werden (200).

Die Androgen-bindenden Komponenten im menschlichen Nierenkarzinom scheinen eine Kreuzreaktivität mit 17ß-Östradiol zu besitzen. Die physiologische Bedeutung dieser Befunde ist jedoch nicht ganz gesichert, da eine signifikante Hemmung der R 1881-Bindung erst durch nicht physiologisch hohe Östrogenkonzentrationen möglich ist. Eine ähnliche Beobachtung teilten BONNE und RAYNAUD (32) für die Rattenprostata mit. Die relative Bindungsaffinität des unmarkierten 17ß-Östradiols beträgt im Vergleich zu nichttritiiertem R 1881 im Prostatacytosol 0.01 und 0.06 im Nierenkarzinom.

Ein möglicher Nachteil der Androgenrezeptorbestimmung mit R 1881 besteht in dessen Kreuzreaktivität mit Progesteronrezeptoren; deren Konzentration ist jedoch bei den meisten untersuchten Nierenkarzinomen gering; die Konzentration Progesteron-bindender Komponenten im Tumorcytosol rezeptorpositiver Patienten übersteigt niemals die 4 fmol-Grenze.

Im Gegensatz dazu findet sich bei den R 1881-Bindungsanalysen in einem Fall ein R 1881-Rezeptorspiegel von 8 fmol/Cytosolprotein, welcher zweimal so hoch ist wie die höchste Progesteronbindungskonzentration. Dies könnte darauf hindeuten, daß R 1881-bindende Komponenten im Nierenkarzinom keine Progesteronrezeptoren sind. Die Existenz eines androgenen Binders im Nierenkarzinom des Menschen würde nicht nur die spezifische Geschlechtsverteilung dieser Erkrankung, sondern auch den Wirkmechanismus der Gestagentherapie einleuchtend erklären: Gestagene Medikamente könnten über einen negativen feedback-Mechanismus die Gonadotropinsekretion und damit den Blutspiegel zirkulierender Androgene, die das Tumorwachstum stimulieren können, (42) senken. Eine direkte auf die Tumorzelle gerichtete und wachstumshemmende Wirkung der Gestagene über die Inhibition des Testosteronabbaues ist nicht wahrscheinlich, da MARBERGER in vitro (127) keinen Einfluß von Gestonorone Caproate (einem Progesteronderivat) auf den Testosteronmetabolismus nachweisen konnte.

Eine endgültige Antwort auf die Frage, welches Wirkprinzip einer Hormontherapie in Form der Androgenapplikation beim metastasierenden Nierenkarzinom

zugrunde liegt, kann noch nicht gegeben werden. Klinische Berichte sprechen allerdings von Erfolgen mit dieser androgenen Therapie bei der Bekämpfung des metastasierenden Mamma- und Nierenkarzinoms (24, 124).

Entscheidend bei der Lösung des Problems ist, die Höhe der therapeutisch wirksamen Hormondosis herauszufinden. Eine in vitro Studie von CARD (42) ergab, daß Testosteron in niedriger Dosierung in der Lage ist, das Tumorwachstum des Nierenkarzinoms zu hemmem; hohe Testosterondosen zeigten dagegen keine Wirkung.

VI. 2. Rezeptoranalysen und Hormonwirkungsstudien an vitalen enzymatisch isolierten Tumorzellen

VI.2a. Zellisolierungsverfahren und Zellmorphologie

Die Methode Hormonrezeptorstudien an intakten Zellen durchzuführen, wurde erstmals an Zellsuspensionen von Thymozyten sowie an Lymphozyten von Patienten mit lymphatischer und myeloischer Leukämie und an Leberzellen (7, 144, 188) erprobt und bietet eine Reihe von Vorteilen:

Dabei wird die Rezeptorbindung an unversehrten Zellen analysiert. Im Gegensatz zu Analysen in Tumorcytosolen bietet diese Methode folgende Vorteile: Durch die

Homogenisation des Tumorgewebes bei der Cytosolpräparation könnten Substanzen mit Enzymcharakter frei werden, die in der intakten Zelle getrennt von den Rezeptoren in anderen Zellkompartimenten lokalisiert sind und bei Rezeptorkontakt die Hormonbinder so verändern, daß sie ihre hohe Affinität für Steroidhormone verlieren (188). Ein weiterer Vorteil von Bindungsstudien an intakten enzymatisch isolierten Zellen ist die Tatsache, daß die Analysen bei physiologischen Temperaturen durchgeführt werden können. Unter diesen Bedingungen kann der gesamte Rezeptorgehalt und nicht nur der unbesetzte Anteil gemessen werden; höhere Temperaturen ermöglichen nämlich einen raschen Austausch zwischen gebundenem endogenen Hormon und den im Versuch eingesetzten radioaktiven Liganden.

Schließlich erfaßt eine Rezeptorbestimmung an intakten Zellen sowohl das Cytoplasma als auch den Zellkern. So kann unabhängig von der in vivo-Hormonkonzentration und der obligatorischen Translokation des Hormonrezeptorkomplexes vom Cytoplasma in den Zellkern der gesamte Rezeptorgehalt der Zelle exakt bestimmt werden.

Die hier dargestellte Methode zur Isolierung stoffwechselaktiver Tumorzellen stellt eine Weiterentwicklung des von BOJAR (26) beschriebenen Verfahrens zur Gewinnung menschlicher Nierentubuli dar. Isolierte

Zellsysteme besitzen gegenüber anderen in vitro-Modellen (Gewebsschnitte, perfundierte Organe) prinzipielle Vorteile (26, 30, 54). Der vermutliche Wirkungsmechanismus, über den durch Kalziumentzug der Zellverband gelockert wird, konnte von BERRY und FREUND (10) an der Rattenleber elektronenmikroskopisch aufgeklärt werden. Durch die Inkubation in kalziumfreien Medien werden die interzellulären desmosomalen Brücken gespalten, die daraus resultierenden Hemidesmosomen zellulär invaginiert und abgebaut.

Die Verwendung von Kollagenase anstelle anderer Enzyme (Trypsin, Lysozym) ist vorteilhaft (26). Mögliche enzymatische Schädigungen der Zellmembran können durch Kollagenase bei sorgfältiger Wahl der für das jeweilige Gewebe geeigneten Konzentration und Einwirkungszeit weitgehend vermindert werden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der isolierten Zellen zeigen eine heteromorphe Tumorzellpopulation, in der verschiedene Stadien der Entdifferenzierung zu erkennen sind. Hochdifferenzierte Zelltypen mit gut ausgebildetem rauhen ER und zahlreichen Mitochondrien (Abb. I) finden sich neben weitgehend entdifferenzierten Organellen-armen Zellen (Abb. F).

Die nach der beschriebenen Methode isolierten Tumorzellen dürften für die Bearbeitung einer Reihe aktueller klinischer Fragestellungen geeignet sein, so. z.B. für eine individuelle prätherapeutische Austestung von Chemotherapeutika.

VI. 2b. Untersuchung der Gestagenbindung

Trotz der Vorteile der Zellisolierungsmethode hatten 5 von 7 Patienten, deren isolierte Tumorzellen untersucht wurden, keine R 5020-Rezeptoren. In einem Fall wurde R 5020 in einer nicht zu sättigenden Bindung aufgenommen (Abb. 9); dies ist definitionsgemäß untypisch für einen Rezeptor. Nur ein Patient zeigte annährungsweise ein Rezeptor-typisches Bindungsverhalten (Abb. 10).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß selbst bei schonender Zellisolierung, die negative Einflüsse auf den Rezeptor weitgehend ausschließt, kein deutlicher Progesteronrezeptor-Gehalt im Gewebe des menschlichen hypernephroiden Nierenkarzinoms festzustellen ist. Diese Tatsache

unterstützt die bereits erläuterten Befunde von 88 Nierenkarzinom-Patienten sowie die Ergebnisse von TOBIN (197) und ROTH-MEYER (177).

VI. 2c. Analyse der Glucocorticoidbindung

Bei 3 Patienten wurde an isolierten Tumorzellen die Glucocorticoidbindung bestimmt; ähnlich wie bei analogen Analysen mit Tumorcytosol fand sich eine rezeptorspezifische geringe Kapazität (s. Abb.11).

Im Hinblick auf eine mögliche Kreuzreaktion mit Medroxyprogesteronacetat sind weitere Analysen geplant.

VI. 2d. Einfluß von Steroidhormonen auf die Proteinsyntheseraten der Tumorzellen

Im Zentrum des Interesses an dem System isolierter Tumorzellen steht die Frage nach der potentiellen Hormonsensibilität hypernephroider Karzinome.

Die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse der Kurzzeit-Tumortestung lassen auf keine akuten Östrogeneffekte schließen. Protrahierte Hormonwirkungen bei chronischer Östradiolapplikation

können allerdings durch die gewählte Versuchsanordnung nicht ausgeschlossen werden und müssen noch weiter erforscht werden.

Die Frage nach der Wirksamkeit östrogener Hormone ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Einerseits können im Tierexperiment durch prolongierte Östrogengabe Nierentumoren erzeugt werden, andererseits konnten in menschlichen hypernephroiden Karzinomen Östrogenrezeptor-ähnliche Komponenten nachgewiesen werden (27), Moleküle, die nur in Zielorganen eines Hormons gefunden werden und deren Anwesenheit eine mögliche Östrogensensibilität dieser Nierentumoren zu signalisieren scheint. In diesem Kontext stellt sich die bedrohliche Frage, ob solche bösartigen renalen Karzinome beim Menschen in Analogie zu den experimentellen Tumoren durch östrogenwirksame Pharmaka, wie z.B. östrogenbetonte Kontrazeptiva induziert werden können. Ein vergleichbarer Zusammenhang ließ sich zwischen der Entstehung von Lebertumoren und der Einnahme oraler Kontrazeptiva sichern (46, 61, 203). Erste klinische Hinweise auf die mögliche kausale Beziehung zwischen Östrogentherapie und der Entwicklung eines Nierenkarzinoms liegen bereits vor (BELLET, 8).

Die Resultate der Pilotstudie zur Gestagen-Sensibilität hypernephroider Nierenkarzinome sind einheitlicher als

die Östrageneffekte (Tabelle 5). Bei allen analysierten Tumoren bewirkte Progesteron eine leichte Hemmung der Proteinbiosynthese. Der schwache Hormoneffekt korreliert gut mit den bei den meisten renalen Karzinomen nur geringfügigen Konzentrationen Gestagenrezeptor-ähnlicher Proteine im Tumorcytosol.

Die Frage bleibt jedoch offen, ob es sich bei den beobachteten Gestageneffekten auf die Proteinsynthese um direkte Gestagenrezeptor-vermittelte Wirkungen handelt.

VII. Schlußfolgerungen

A Die Rezeptorstudien im Tumorcytosol zeigen:

1. Der Gehalt an Gestagenrezeptor-ähnlichen Komponenten ist gering.

2. Die Östrogenapplikation hat im allgemeinen keinen Einfluß auf die Höhe des Gestagen-Rezeptorgehaltes; nur in wenigen Fällen konnte eine hochdosierte Östrogengabe einen über dem Durchschnitt liegenden Gestagen-Rezeptorspiegel hervorrufen.

3. Es existieren Inhibitoren der Gestagenbindung, deren biochemische Natur noch unbekannt ist.

4. Die entdeckten Inhibitoren der Gestagenbindung erklären nicht den hohen Anteil Gestagenrezeptor-negativer Tumoren.

5. Der Nachweis von - wenn auch niedrigen Glucocorticoidrezeptor-Konzentrationen - im Nierenkarzinom und die Kreuzreaktion mit dem therapeutisch z.T. wirksamen Medroxyprogesteronacetat könnten einige klinische Berichte über eine erfolgreiche Gestagentherapie des Nierenkarzinoms experimentell stützen.

6. Androgenrezeptoren konnten ebenfalls in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden; dies korreliert gut mit dem klinisch teilweise erfolgreichen Einsatz androgener Substanzen.

B Die Rezeptoranalysen und Hormonwirkungsstudien an isolierten Zellen haben ergeben:

1. Im Vergleich zu Zellkulturen dürfte es sich bei den frisch isolierten Zellen um ein repräsentatives, nicht durch die unterschiedliche Wachstumsaktivität

einzelner Zellpopulationen (z.B. Fibroblasten) verfälschtes Untersuchungsmaterial handeln. Die isolierten Tumorzellen können sowohl für die allgemeine Erprobung von Chemotherapeutika als auch für die individuelle prätherapeutische Tumortestung und pharmakodynamische Untersuchung Bedeutung gewinnen.

2. Für Östrogene konnte in Kurzzeitexperimenten ein tumoranaboler bzw. antikataboler Effekt ausgeschlossen werden.

3. Gestagene scheinen dagegen eine geringe tumorkatabole bzw. antianabole Wirkung zu entfalten.

IX. Ausblick

Die Hoffnung, durch Steroidrezeptor-Nachweis im Nierenkarzinom des Menschen biochemisch begründbar und gezielt die Hormontherapie gegen diese meist infauste Erkrankung einzusetzen, hat sich nur teilweise erfüllt.

Die Rezeptoruntersuchungen an über 160 Nierenkarzinomen haben gezeigt, daß in einigen Fällen eine Hormontherapie durchaus sinnvoll erscheint. Dies gilt insbesondere deshalb, weil Progesteronderivate offensichtlich nicht nur über den Gestagen-, sondern auch den Glucocorticoidrezeptor wirksam sein können. Die inhibitorische

Potenz des Progesterons bestätigt sich auch dadurch, daß es in der Lage ist, die Proteinsynthese im Tumor zu hemmen. Die Rolle der Androgenrezeptoren wird in dieser Studie nur angedeutet, bestätigt aber auch klinische Berichte, die von einer Tumorregression nach Androgentherapie berichten.

Sinnvoll erscheint es, die Hormontherapie dann einzusetzen, wenn individuell nach der Tumornephrektomie das Karzinom auf das Vorliegen von Steroidhormon-Rezeptoren untersucht wird.

Liegen Hormonrezeptoren vor und erscheint eine Hormontherapie klinisch gerechtfertigt, so sollte diese in Zukunft als therapeutische Maßnahme genutzt werden. Dies gilt auch für das Vorliegen solitärer und multipler Metastasen. Der Patient sollte dann in regelmäßiger klinischer Kontrolle bleiben, um anhand von Röntgenaufnahme und Ganzkörperszintigramm den Therapieerfolg messen zu können.

Die Rezeptor-positiven Patienten dieser Untersuchung wurden einer Hormontherapie mit Medroxyprogesteronacetat unterzogen; erste Ergebnisse stehen noch aus.

Literaturverzeichnis

1. ALBERTO, P., SENN, H.J.: Cancer 33: 1226 (1974).

2. ARNER, O., SCHREEB, von, T.: Acta Chir. Scand. 132: 370 (1966).

3. ASSELIN, J., LABRIE, F., GOURDEAU, J., BONNE, C., RAYNAUD, J.P.: Steroids 28: 449 (1976).

4. AYRES, B.E., NEWALL, C.E., PHILLIPS, G.H.: Steroids 26: 219 (1975).

5. BANDHAUER, K., OBERMAYER, W.: Urol. int. 29: 421 (1974).

6. BATTKE, H.: Zschr. Urol. 2: 147 (1973).

7. BAXTER, T.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 932 (1971).

8. BELLET, R.E., SQUITIERI, A.P.: J. Urol. 112: 160 (1974).

9. BERCKER, R., MAGNUS, L.: Med. Welt 46: 2523 (1968).

10. BERRY, M.N., FRIEND, D.S.: J. Cell. Biol. 43: 506 (1969).

11. BIBUS, B., HOHENFELLNER, R.: Urol. int. 4: 183 (1957).

12. BISCHOFF, W.: Aktuelle Urologie 9: 117 (1978).

13. BLOOM, H.J.G., DUKES, C.E., MITCHLEY, B.C.V.: Brit. J. Cancer 17: 611 (1963).

14. BLOOM, H.J.G., BAKER, W.H., DUKES, C.E., MITCHLEY, B.C.V.: Brit. J. Cancer 17: 646 (1963).

15. BLOOM, H.J.G.: Hormone treatment of renal tumours. In: Riches, E.W.: Tumours of the kidney and ureter. London: Livingstone 1964.

16. BLOOM, H.J.G.: The kidney. In: Raven, R.W., Roe, F.J.C.: Prevention of Cancer. London: Butterworths 1967.

17. BLOOM, H.J.G., ROE, F.J.C., MITCHLEY, B.C.V.: Cancer 20: 2118 (1967).

18. BLOOM, H.J.G.: Treatment of renal cell carcinoma with steroid hormones: Observations with transplanted tumours in the hamster and in curable cancer in man. In: King, J.S.: Renal neoplasia. Boston: Little, Brown, 1967.

19. BLOOM, H.J.G.: JAMA 204: 143 (1968).

20. BLOOM, H.J.G.: Brit. J. Cancer 25: 250 (1971).

21. BLOOM, H.J.G., WALLACE, D.M.: Tumours of the urinary tract. In: Zuppinger, A.: Handbuch der medizinischen Radiologie, Bd. XIX/3. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1971.

22. BLOOM, H.J.G.: Renal cancer. In: Stoll, B.A.: Endocrine therapy in malignant disease, p. 339. London - Philadelphia - Toronto: Saunders 1972.

23. BLOOM, H.J.G.: Brit. J. Urol. 45: 250 (1973).

24. BLOOM, H.J.G.: Cancer 32: 1066 (1973).

25. BLUM, R.H., CARTER, S.K., AGRE, V.: Cancer 31: 903 (1973).

26. BOJAR, H., BALZER, K., STAIB, W.: Z. Klin. Chem.Klin. Biochem. 13: 31 (1975).

27. BOJAR, H., DREYFÜRST, R., BALZER, K., STAIB, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14: 521 (1976).

28. BOJAR, H., DREYFÜRST, R., BALZER, K., STAIB, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15: 319 (1977).

29. BOJAR, H., MAAR, K., DREYFÜRST, R., STAIB, W.: Östrogenrezeptoren in der menschlichen Niere. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol., 29. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1978.

30. BOJAR, H., DITTMANN, H., HETTWER, H., STAIB, W.: Urologia internationalis (submitted to publication, 1978).

31. BONNE, C., RAYNAUD, J.P.: Steroids 26: 227 (1975).

32. BONNE, C., RAYNAUD, J.P.: Steroids 27: 497 (1976).

33. BRAREN, V., TAYLOR, J.N., PACE, W.: Urology 3: 777 (1974).

34. BRATHERTON, M.B.: Brit. J. Radiol. 37: 141 (1964).

35. BROSIG, W., BAUMGÄRTEL, H., OESER, H.: Die präoperative Bestrahlung der Nierentumoren aus chirurgisch-urologischer Sicht. In: Hug, O.: Präoperative Tumorbestrahlung. München - Berlin - Wien: Urban & Schwarzenberg 1971.

36. BRÜHL, P., SCHEEF, W., ALBERT, H., BÜCHELER, E.: Dtsch. Ärzteblatt 41, 2919 (1974).

37. BRÜHL, P., SCHEEF, W., ALBERT, H., BÜCHELER, E.: Med. Klin. 70, 873 (1975).

38. BULLOCK, L.P., BARDIN, C.W.: Endo 94: 746 (1974).

39. BULLOCK, L.P., BARDIN, C.W.: Endo 97: 1106 (1975).

40. CAKE, M.H., LITWACK, G.: In: Litwack, G.: Biochemical actions of hormones, Vol. III, New York: Academic Press 1975.

41. CANNON, P.J., BAUMGARTNER, G., WAJSMAN, Z., MERRIN, C.: Urology 7: 18 (1976).

42. CARD, D.J., KOHORN, E.I., LYTTON, B.: Surgical Forum 21: 532 (1970).

43. CARL, P., RABES, H., EISENBERGER, F., SCHMIDT, P.: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese bestrahlter und nicht bestrahlter Nierenkarzinome bei normothermer Perfusion. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol., 26. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York, Springer 1974.

44. CARTER, S.K., WASSERMAN, T.H.: Cancer 36: 729 (1975).

45. CAVALLI, F., BRUNNER, K.W.: Dtsch. Med. Wschr. 27: 1087 (1978).

46. CHRISTOPHERSON, M.D., MAYS, E.T.: J. Natl. Cancer Inst. 58: 167 (1977).

47. CONCOLINO, G., MAROCCHI, A., Di SILVERIO, F., CONTI, C.: J. Steroid. Biochem. 7: 923 (1976).

48. CONCOLINO, G., MAROCCHI, A., TENAGLIA, R., BRACCI, U.: Hormonal therapy and steroid receptors in human cell carcinoma. First Innsbruck Winter Conference on Biochemistry in Clinical Medicine. January 1978 (in press).

49. COX, E.E., LACY, S.S., MONTGOMERY, W.G., BOYCE, W.H.: J. Urol. 104: 53 (1970).

50. CUMMINGS, K.B., WHEELIS, R.F., NELSON, F.W.: J. Urol. 117: 269 (1977).

51. DEIMLING, von, O., KELLER, W., ROSSNER, R., OEHLERT, W.: Histochemie 15: 333 (1968).

52. DENK, W.: Wien. klin. Wschr. 78: 509 (1966).

53. DIGNAM, W.S., VOSKAIN, J., ASSALI, N.S.: J. Clin. Endocrinology 16: 1032 (1956).

54. DREYFÜRST, R.: Dissertationsschrift, Düsseldorf 1977.

55. DROCHMANS, P., WANSON, J.C., MOSSELMANS, R.: J. Biol. Chem. 234: 1 (1975).

56. DUBOVSKY, J., KOCHAKIAN, C.D.: Endocrinology 92: 917 (1973).

57. EAGLE, H.: J. Biol. Chem. 214: 839 (1955).

58. EAGLE, H.: J. exp. Med. 102: 37 (1955).

59. EAGLE, H.: Science 130: 432 (1959).

60. EBERHARDT, H.-J., STRIETZEL, M., RAATZSCH, H., SCHMECHEL, C.: Radiobiol. Radiother. 10: 719 (1969).

61. EDMONSTON, H.A., HENDERSON, B., BLUTON, B.: N. Engl. J. Med. 294: 470 (1977).

62. EHRHARDT, H.: Onkologische Behandlungsmöglichkeiten von Nieren und Nierenbeckentumoren. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol., 26. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1974.

63. FELDMÜLLER, M., FASSBENDER, C.W., PENNEKAMP, H., HÜHN, E.A.: Dtsch. med. Wschr. 99: 1414 (1974).

64. FLOCKS, R.H., KADESKY, M.C.: J. Urol. 79: 196 (1958).

65. FREED, S.Z., HALPERIN, J.P., GORDON, M.: J. Urol. 118: 538 (1977).

66. FRIEDEN, E.H., KU, C.-C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137:1110 (1971).

67. GARFIELD, D.H., KENNEDY, B.J.: Cancer 30: 190 (1972).

68. GAUWERKY, F., ADAM, K.: Strahlentherapie 142: 629 (1971).

69. GAUWERKY, F.: Dtsch. Ärztebl. 70: 275 (1973).

70. GERHARDT, P.: Röntgen-Bl. 19: 120 (1966).

71. GHANADIAN, R., AUF, G., CHALONER, P.J., CHISHOLM, G.D.: J. Steroid Biochem. 9: 325 (1978).

72. GLOOR, J., BANDI, B.: Helv. Chir. Acta 33: 416 (1966).

73. GÖDDE, S.: Dtsch. med. J. 19: 707 (1968).

74. GORSKI, J., NOCOLETTE, J.A.: Arch. Biochem. Biophys. 103: 418 (1963).

75. GOSH, S.K., DONEGAN, W.L.: J. Urol. 104: 380 (1970).

76. GUDAT, F., DEIMLING, von, O., NEMITZ, H., NOLTENIUS, H.: Histiochemie 11: 253 (1967).

77. GUPTA, G.N.: Analyt. Chem. 38: 1356 (1966).

78. HAGAN, K., TRAPP, J.D., RHAMY, R.K.: South. Med. J. 67: 1175 (1974).

79. HECHTER, O., HALKERSTON, J.D.K.: Hormones 5: 697 (1964).

80. HEINZE, H.G., SCHWÄRZLER, B.: Strahlentherapie 141: 275 (1971).

81. HENDRY, W.F.: Nursing times 19: 730 (1977).

82. HERBST, W.E., COOLEY, R.N., OZARDA, A.T.: Amer, J. med. Sci. 252: 603 (1966).

83. HIENZSCH, E.: Urologe 1: 89 (1962).

84. HOGE, A.F., SHAW, M.T., BOTTOMLEY, R.H., HARTSUCK, J.M.: JAMA 231: 1357 (1975).

85. HOLLAND, J.: Cancer 5: 1030 (1973).

86. HOOGSTRATEN, B., GOTTLIEB, J.A., CAOILI, E.: Cancer 32: 38 (1973).

87. HORNING, E.S., WHITTICK, J.W.: Brit. J. Cancer 8: 451 (1954).

88. HORWITZ, K.B., McGUIRE, W.L., PEARSON, O.H., SEGALOFF, A.: Science 189: 726 (1975).

89. HÜBENER, K.-H., EIBACH, E.: Strahlentherapie 153: 726 (1977).

90. HUDGINS, P.T.: Amer. J. Roentgenol. 96: 620 (1966).

91. HUG, O.: Die strahlenbiologische Basis einer präoperativen Tumorbestrahlung. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol., 26. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1974.

92. HRUSHESKY, W.J., MURPHY, G.P.: J. Surg. Oncol. 9: 277 (1977).

93. JÄNNE, O., KONTULA, K., LINIKKAINEN, T., VIHKO, R.: J. Steroid Biochem. 6: 501 (1975).

94. JAKOUBKOVA, J., BEK, V., HAVRANKOVA, N., ABRAHAMOVA, J., KVAPIL, F.: Neoplasma 17: 321 (1970).

95. JENSEN, E.V., JACOBSEN, H.I.: In: Pincus, G., Vollmer, E.P.: Biological activities of steroids in relation to cancer. New York: Academic Press 1960.

96. JENSEN, E.V.: Proc. 4th Intern. Congr. Biochem. Wien. Oxford: Pergamon Press 1960.

97. JENSEN, E.V., De SOMBRE, E.R.: Ann. Rev. Biochem. 41: 203 (1972).

98. JOHNSON, J.A., DAVIS, J.O., BAUMBER, J.S., SCHNEIDER, E.G.: Am. J. Physiol. 219: 1691 (1971).

99. JOHNSON, D.E., CHALBAUD, R.A., HOLOYE, P.Y., SAMUELS, M.L.: Cancer Chemother. Rep. 59: 433 (1975).

100. JUNGBLUTH, P.W., HÄTZEL, I., De SOMBRE, E.R., JENSEN, E.V.: 18. Kolloq. Ges. Physiol. Chem., Mosbach 58. Berlin- Heidelberg - New York: Springer 1967.

101. KEWELOH, E.: Dissertationsschrift Düsseldorf, 1964.

102. KING, R.J.B., MAINWARING, W.J.P.: Kidney in steroid-cell interactions. Baltimore, Maryland: Univ. Park 1974.

103. KIRKMAN, H., BACON, R.L.: Cancer Res. 10: 122 (1957).

104. KIRKMAN, H.: Nat. Cancer Inst. Monogr. 1. Washington U.S. Government printing office, 1959.

105. KLIPPEL, K.F., JAKSE, G.: Aktuelle Urologie 4: 205 (1978).

106. KÖLLN, C.P., BOLDUS, R.A., BRANDON, D.N.K., FLOCKS, R.H.: J. Urol. 105: 45 (1971).

107. KÖRNER, F., HARTMANN, M.: Die zytologische Behandlung maligner Tumoren unter besonderer Berücksichtigung der sog. Teilsynchronisation. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol. 27. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1974.

108. KOCHAKIAN, C.D., HILL, J., AONUMA, S.: Endo 72: 354 (1963).

109. KOCHAKIAN, C.D.: Steroids 14: 77 (1969).

110. KOCHAKIAN, C.D., NISHIDA, M., HIRONE, T.: Amer. J. Physiol. 217: 383 (1969).

111. KOLLWITZ, A.A., KULT, K.: In: Verh. Dtsch. Ges. Urol. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1958.

112. KORENMAN, S.G.: J. Clin. Endocr. Metab. 28: 127 (1968).

113. KORENMAN, S.G.: Steroids 13: 163 (1969).

114. KOTHS, K.E., GODCHAU, W., DOEG, L.H., DOEG, K.A.: Endo 91: 125 (1972).

115. KOULUMIES, M., SALLINEN, A.: Ann. Chir. Gynec. Fenn. 55: 40 (1966).

116. KREBS, H.A., HENSELEIT, K.: Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 210: 33 (1932).

117. KROKOWSKI, E.H.: Drei grundsätzlich verschiedene Vorbestrahlungsmodi und ihre Erfolgsbewertung. In: Hug, O.: Präoperative Tumorbestrahlung. Dtsch. Röntgenologenkongreß München - Berlin - Wien: Urban & Schwarzenberg 1971.

118. LI, J.J., TALLEY, D.J., LI, S.A., VILLEE, C.A.: Endo 95: 1134 (1974).

119. LIEVEN, von, H., HAHN, D.: Münch. med. Wschr. 119: 1089 (1977).

120. LISSNER, J.: In: Verh. Dtsch. Ges. Urol. 26. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1974.

121. LOKICH, J.J., SKARIN, A.T.: Cancer Chemother. Rep. 56: 761 (1972).

122. LOKICH, J.J., HARRISON, J.H.: J. Urol. 114: 371 (1975).

123. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., FARR, A.L., DALL, R.J.: J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).

124. McGUIRE, W.L., HORWITZ, K.B., PEARSON, O.H., SEGALOFF, A.: Cancer 39: 2934 (1977).

125. MAILLOT, von, K.: Steroid receptors in malignant tumours of male patients. First Innsbruck Winter Conference on Biochemistry in Clinical Medicine. January 1978 (in press).

126. O'MALLEY, B.W., MEANS, A.R.: In: O'Malley, B.W., Means, A.R.: Receptors for reproductive hormones. New York: Plenum Press 1973.

127. MARBERGER, M., ALTWEIN, J.E., ORESTANO, F.: Investigative Urology 13: 302 (1976).

128. MARTIN, R.G., AMES, B.N.: J. Biol. Chem. 236: 1372 (1961).

129. MARTIN, A.N., SWARBRICK, J., CAMMARATA, A.: In: Erhardt, L.: Physikalische Pharmazie 1, 1. Stuggart: Wissenschaftliche Verlagsanstalt 1975.

130. MATTHEWS, U.S., KIRKHAM, H., BACON, R.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66: 195 (1947).

131. MELANDER, O., NOTTER, G., SCHREEB, von, T.: Nordisk Med. 78: 1309 (1967).

132. MERIDIES, R., LENZ, P.: Urologe 10: 958 (1971).

133. MERRIN, C.: J. Urol. 113: 21 (1975).

134. MERRIN, C., MITTELMAN, A., FANOUS, N., WAJSMAN, Z., MURPHY, G.P.: J. Urol. 113: 21 (1975).

135. MIDDLETON, R.G.: J. Urol. 97: 973 (1967).

136. MITTELMAN, A., ALBERT, D.J., MURPHY, G.P.: JAMA 225: 32 (1973).

137. MINTON, J.P., PENNLINE, K., NAWROCKI, J.F., KIBBEY, W.E., DODD, M.C.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. and Amer. Soc. Clin. Oncol. 17: 301 (1976).

138. MONTIE, J.E., BUKOWSKI, R.M., DEODHAR, Sh., D., HEWLETT, J.S., STEWART, B.H., STRAFFON, R.A.: J. Urol. 117: 553 (1977).

139. MONTIE, J.E., STEWART, B.H., STRAFFON, R.A., BANOWSKI, L.H.W., HEWITT, C.B., MONTAGUE, D.K.: J. Urol. 117: 272 (1977).

140. MORALES, A., KIRULTA, G., LOTT, S.: J. Urol. 114: 692 (1975).

141. MORALES, A., EIDINGER, D.: J. Urol. 115: 377 (1976).

142. MORGAN, J.F., MORTON, H.J., PARKER, R.C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73: 1 (1950).

143. MOWSZOWICZ, J., BARDIN, G.W.: J. Steroid Biochem. 5: 344 (1974).

144. MUNCK, A., WIRA, Ch.: Methods for assessing hormone receptor kinetics with cells in suspension: receptor-bound and non-specifically bound hormone. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O.: Methods in enzymology XXXVI. Ed. O'Malley, B.W., Hardman, J.G., New York - San Francisco - London: Academic Press 1975.

145. MURPHY, G.P.: Proc. Natl. Cancer Conf. 7: 751 (1973).

146. OBRECHT, H.P., MAYR, A.C., NAGEL, G.: Schweiz. med. Wschr. 103: 1414 (1973).

147. OCHSNER, M.G., BRANNON, W., POND, H.S., GOODIER, E.H.: J. Urol. 110: 643 (1973).

148. OSSWALD, B.: Dissertationsschrift, Gießen 1967.

149. PAINE. C.H., WRIGHT, F.W., ELLIS, F.: Brit. J. Cancer 24: 277 (1970).

150. PAPAC, R.J., ROSS, St. A., LEVY, A.: Amer. J. med. Sci. 274: 281 (1977).

151. PAPAC, R.J.: Proc. Amer. Cancer Res. 10: 67 (1969).

152. PAUL, J.: In: Paul, J.: Cell and tissue culture 5: 368. London - New York: Livingstone 1975.

153. PEELING, W.B., MANTELL, B.S., SHEPHERD, G.F.: Brit. J. Urol. 41: 23 (1969).

154. PETERSON, L.J., GRIMES, J.H., DEES, J.E., ANDERSON, E.E.: Urology 4: 669 (1974).

155. PFEIFFER, J.: Radiobiol. Radiother. 11: 357 (1970).

156. PHILIBERT, D., RAYNAUD, J.P.: Contraception 10: 457 (1974).

157. POWERS, W.E.: J. Canad. Ass. Radiol. 16: 217 (1965).

158 PREEDY, J.R.K., AITKEN, E.H.: J. Clin. Invest. 35: 423 (1956).

159. RADEV, A.T.: Probl. Endocrinol. (Mosk) 76: 96 (1971).

160. RAFLA, S.: Cancer 25: 26 (1970).

161. RAO, B.R., WIEST, W.G., ALLEN, W.M.: Endocrinology 92: 1229 (1973).

162. RASPE, G.: In: Raspe G.: Advances in Bioscenes 7, New York: Pergamon Press 1971.

163. REBOUL, J., BALLANGER, F., DELORME, G., TAVERNIER, J., GEINDRE, M.: Ann. Radiol. 5: 283 (1962).

164. REEL, J.R., SMITH, Y.: Acta endocr. (Kbh.) 80: 344 (1975).

165. RICHES, E.: In: Tumours of the kidney and ureter. Edinburgh - London: Livingstone 1964.

166. RICHES, E.: J. Urol. 79, 190 (1958).

167. RICHES, E.: In: Alken, C.E., Dix, V.W., Weyrauch, H.M., Wildbolz, E.: Handbuch der Urologie. Bd. XI/1. Berlin - Heidelberg- New York: Springer 1967.

168. RICHES, E.: JAMA 204: 138 (1968).

169. RICHES, E.: J. Amer. med. Ass. 204: 230 (1968).

170. RICHES, E.: Adjunctive preoperative radiotherapy followed by nephrectomy for renal carcinoma. In: Scott, R.: Current controversies in urologic management. Philadelphia: Saunders, W.B., 1972.

171. RICHTERISCH, R.: In: Richterisch, R.: Klinische Chemie. Basel: Karger 1971.

172. RICK, W.: In: Rick, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie. Berlin-Heidelberg - New York: Springer 1972.

173. RINGLEB, D., ROMMEL, K.: Strahlentherapie 121: 323 (1963).

174. ROBSON, C.J., CHURCHILL, B.M., ANDERSON, W.: J. Urol. 101: 297 (1969).

175. ROMMEL, K.: Dissertationsschrift, Marburg 1963.

176. ROST, A., BROSIG, W., RIEDEL, B., PUST, R.: Erfahrungen mit der präoperativen Radiotherapie beim hypernephroiden Karzinom. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol. 26. Tagg. Berlin - Heidelberg-New York: Springer 1974.

177. ROTH-MEYER, C., RAFESTIN-OBLIN, M.E., MICHAUD, A., CLAIRE, M., BRISSET, J.M., CORVOL, P.: Steroid receptors in normal and neoplastic human kidney. First Innsbruck Winter Conference on Biochemistry in Clinical Medicine. January 1978 (in press).

178. RÜEDI, P., MAYOR, G., SULMONI, A.: Zschr. Urol. 68: 492 (1975).

179. SAMUELS, H., TOMKINS, G.M.: J. Mol. Biol. 52: 57 (1970).

180. SAMUELS, M.L., SULLIVAN, P., HOWE, C.D.: Cancer 22: 525 (1968).

181. SCATCHARD, G.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949).

182. SCHMIEDT, E.: In: Alken, C.E., Staehler, W.: Klinische Urologie, Stuttgart: Georg Thieme 1973.

183. SCHMIEDT, E., RABES, H., CARL, P.: Eur. Urol., 3: 183 (1977).

184. SCHMITZ, W.: Urologe 6: 139 (1967).

185. SILBER, J.S., CHANG, Ch.Y., GOULD, F.: Brit. J. Urol. 47: 259 (1975).

186. SKINNER, D.G., DEKERNION, J.B., BROWER, P.A., RAMMING, K.P., PILCH, Y.H.: J. Urol. 115: 246 (1976).

187. SLEIN, M.W.: In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O.: Methods in Enzymology 10: 345. New York - London: Academic Press 1962.

188. SLOWMAN, J.C.: Glucocorticoid action and leukemia (in press) 1978.

189. SONBORN, B.M., RAO, B.R., KORENMAN, S.G.: Biochemistry 10: 4955 (1971).

190. SPELSBERG, Th., TOFT, D.O.: The mechanism of action of progesterone. In: Pasqualini, J.R.: Receptors and mechanisms of action of steroid hormones, part I, p. 261. Modern pharmacology-toxicology, New York - Basel: Dekker, M. 1977.

191. STEGGLES, A.W., KING, R.J.B.: Europ. J. Cancer 4: 395 (1968).

192. STEGGLES, A.W., KING, R.J.B.: Europ. J. Cancer 8: 323 (1972).

193. TALLEY, R.W., MOORHEAD, E.L., TUCKER, W.G., SAN DIEGO, E.L., BRENNAN, M.J.: JAMA 207, 322 (1969).

194. TALLEY, R.W.: Cancer 32, 1062 (1973).

195. TCHAO, R., EASTY, G.C., AMBROSE, E.J., RAVON, R.W., BLOOM, H.J.G.: Europ. J.Cancer 4, 39 (1968).

196. THIELECKE, R.: Dissertationsschrift, Lübeck 1969.

197. TOBIN, E.H., MOUHADDEB, I., BLOOM, N.D.: Analysis of specific progesterone receptor proteins in human normal kidney and renal cell carcinoma. First Innsbruck Winter Conference on Biochemistry in Clinical Medicine. January 1978 (in press).

198. TOFT, D., GORSKI, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55: 1574 (1966).

199. TRÄGER, L.: Steroidhormone (Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung) Berlin - Heidelberg- New York, Springer 1977.

200. TREMBLAY, R.R., DUBE, J.J., MY ANH HO-KIM, LESAGE, R.: Steroids 29: 185 (1977).

201. TSUCHIDA, S., SUGAWARA, H., HARATA, T., YAMAGUCHI, O., ARAI, S.: Tohoku J. Exp. Med. 113: 319 (1974).

202. VAHLENSIEK, W.: Zytostatika in der Urologie. In: Verh. Dtsch. Ges. Urol., 24. Tagg. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1972.

203. VANA, J., MURPHY, G.P., ARONOFF, B.L., BAKER, H.W.: JAMA 238: 2154 (1977).

204. DeVRIES, J.R., LUDENS, J.H., FANESTIT, D.O.: Kidney Interational 2, 95 (1972).

205. WAGLE, D.G., SCAL, D.R.: J. Surg. Oncol. 2: 23 (1970).

206. WAGLE, D.G., MURPHY, G.P.: Cancer 28: 318 (1971).

207. WASMUND, H.-G., SCHNEIDER, H.-J.: Zschr. ärztl. Fortbild. 64, 222 (1970).

208. WATERS, C.A.: Am. J. Roentgenol. 33: 145 (1935).

209. WEICHSELBAUM, T.E.: Amer. J. Clin. Path. 10: 40 (1946).

210. WELLS, C.A.: Br. J. Urol. 26: 324 (1954).

211. WAHRTON, L.R.: Arch. Surg. 30, 35 (1935).

212. WITTLIFF, J.L.: Seminars in Oncology 1, 109 (1974).

213. WOODRUFF, M.W.: J. Urol. 97, 611 (1967).

214. ZUPPINGER, A.: Die Vorbestrahlung. Einleitende Übersicht. In: Hug, O.: Präoperative Tumorbestrahlung) Dtsch. Röntgenkongreß 1970) München - Berlin - Wien: Urban & Schwarzenberg 1971.

Danksagung

Herr Prof. Staib und Herr Priv.-Doz. Dr. Bojar berieten mich in biochemischen Fragen.

Herr Dr. Hettwer fertigte die elektronenmikroskopischen Bilder der Tumorzellen an.

Die eingangs erwähnten Urologischen Kliniken ermöglichten die Untersuchungen an umfangreichem Tumormaterial.

Ihnen allen gilt mein besonderer Dank.